
TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Studijní program: P 3901 Aplikované vědy v inženýrství

Studijní obor: 3901V025 Přírodovědné inženýrství

Vývoj nanovláknenného nosiče pro hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou a využití obrazové analýzy pro hodnocení biofilmových struktur

Development of nanofiber carrier for hybrid bioreactors with immobilized biomass and using image analysis for biofilm structures evaluation

Disertační práce

Autor:

Ing. Lucie Křiklavová

Vedoucí práce:

Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

V Liberci 25. 6. 2013

Doktorand: *Ing. Lucie Křiklavová*
Školitel: *Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.*

Forma studia: *prezenční*
Studijní program: *P 3901 Aplikované vědy v inženýrství*
Studijní obor: *3901V025 Přírodovědné inženýrství*
Tematický okruh: *Biotechnologie*
Studium: *1. 7. 2009 – 30. 6. 2013*

Technická univerzita v Liberci
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Studentská 2
461 17 Liberec 1
Tel.: +420 48 535 (3895), e-mail: lucie.kriklavova@tul.cz

Prohlášení o duševním vlastnictví a autorských právech

Byla jsem seznámena s tím, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Disertační práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím disertační práce a konzultantem.

Datum

Podpis

A OBSAH

A	OBSAH	5
	Seznam zkratk a symbolů	9
	Seznam obrázků	9
	Seznam tabulek	14
B	ABSTRAKT	15
C	ABSTRACT	16
D	CÍLE A PŘÍNOSY DISERTAČNÍ PRÁCE	17
E	TEORETICKÁ ČÁST	18
1	BIOLOGICKÉ ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD	18
1.1.	Biofilm jako společenství mikroorganismů	18
1.2.	Přínos imobilizace mikroorganismů v biofilmu	19
1.3.	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	20
1.4.	Základní struktura a vlastnosti biofilmu	20
	1. Koncentrace biomasy v biofilmu	20
	2. Fimbrie a výčnělky biofilmu	21
	3. EPS	21
	4. Tloušťka biofilmu	21
	5. Vodní kanálky a doprava hmoty (difuze)	22
	6. Quorum sensing	22
	7. Charakter genové exprese	22
	8. Stabilita biofilmu	23
1.5.	Podmínky pro vznik biofilmu a jeho životní cyklus	23
1.6.	Klasifikace biofilmových reaktorů	27
	a) Zkrápěné biologické kolony (tzv. biofiltry)	27
	b) Rotační biofilmové reaktory	27
	c) Ponořené biologické kolony	27
	d) Reaktory s kombinovanou kultivací biomasy	28
	Systém MBBR	28
1.7.	Nosiče biomasy	28
1.7.1	Hlavní požadavky na nosič biomasy	29
1.7.2	Přehled nosičů biomasy	30
1.7.3	Nosiče biomasy AnoxKaldnes (Veolia Inc.)	32
	Nosič AnoxKaldnes typ K3	32
1.7.4	Textilní nosiče biomasy	33
	a) Nosiče biomasy – pleteniny	33
	b) Nosiče biomasy – tkaniny a netkané textilie	34
	c) Nosiče biomasy – nespecifikované textilie a ostatní	35
2	OBRAZOVÁ ANALÝZA BIOFILMOVÝCH STRUKTUR	37
2.1.	Pořízení obrazu	37
2.2.	Korekce obrazu	38
2.2.1.	Před-zpracování obrazu	38
2.2.2	Vylepšení obrazu	38
2.2.3.	Barevné prostory obrazu	39
	1) RGB barevný prostor	39
	2) CIEL*a*b* barevný prostor	39
	3) HSV barevný prostor	40
	4) Šedotónový a černo-bílý barevný prostor	41
2.3.	Segmentace obrazu	41
2.4.	Morfologické zpracování obrazu	42

2.5.	Identifikace oblastí.....	42
2.5.1.	Metoda component labelling.....	42
2.5.2.	Shlukovací algoritmus K-Means	43
2.6.	Charakterizace oblastí	44
2.6.1.	Plošné parametry.....	44
1)	Plošná porozita a Eulerovo číslo	44
2)	Obvod a obsah	45
3)	Délka běhu (horizontální, vertikální)	45
4)	Orientace	46
5)	Kruhovitost a excentricita	46
6)	Ekvivalentní průměr kruhu	47
7)	Difuzní vzdálenost	47
8)	Fraktální dimenze	47
9)	Solidita	49
2.6.2.	Texturní parametry	49
1)	Výpočet co-occurrence matice (matice souběžného výskytu)	50
2)	Matice prostorové závislosti	50
3)	Entropie, energie, homogenita	51
F	PRAKTICKÁ ČÁST.....	53
Fa.	MATERIÁLY, METODY, EXPERIMENTÁLNÍ SET-UP	53
1.1.	Odpadní voda a její hodnocení.....	53
1.1.1.	Detekce koncentrace polutantů.....	53
	Chemická spotřeba kyslíku (CHSK).....	53
	Celkové fenoly	54
	Celkový chlór.....	54
1.1.2.	Anilin, kyanidy, DPG	54
	Anilin – $C_6H_5NH_2$	54
	Kyanidy – CN^-	55
	Difenyguanidin – $C_{13}H_{13}N_3$	55
a)	Reálná odpadní voda.....	55
b)	Modelová odpadní voda.....	56
1.1.3.	Fenoly, kresoly, dimethylfenoly	56
	Fenol – C_6H_5OH	56
	Kresol – $CH_3C_6H_4OH$	56
	Dimethylfenol – $(CH_3)_2C_6H_3OH$	57
a)	Reálná odpadní voda.....	57
b)	Modelová odpadní voda.....	57
1.1.4.	Chloramin B	57
a)	Reálná odpadní voda.....	58
1.2.	Mikroorganismy a jejich hodnocení.....	58
1.2.1.	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	58
1.2.2.	Příprava inokula	58
1.2.3.	Stanovení růstu buněčné populace.....	58
	Stanovení dispergovaných mikroorganismů.....	58
	Stanovení sušiny	59
	Stanovení adheze mikrobiálních buněk k povrchu, hodnocení kolonizace	59
1.2.4.	Mikroskopie	59
1.2.5.	Respirační testy	60
1.3.	Nosiče biomasy	61
	Výroba nanovláken	61
1.4.	Reaktory.....	62
1.5.	Použité chemikálie a vybavení	64
1.5.1.	Chemikálie.....	64
1.5.2.	Pomůcky a přístrojové vybavení	64

Fb. VÝSLEDKY A DISKUSE	65
2. VÝVOJ NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE	65
2.1. <i>Nosič biomasy jako určující prvek při čištění odpadních vod</i>	<i>65</i>
2.2. <i>Charakterizace nanovláknenného nosiče</i>	<i>68</i>
2.2.1 <i>Historie vývoje nanovláknenných nosičů</i>	<i>68</i>
a) <i>Vývoj nanovláknenné nitě jako nosiče biofilmu</i>	<i>68</i>
b) <i>Návrh a vývoj fixních nosičů</i>	<i>70</i>
c) <i>Návrh a vývoj fluidních nosičů</i>	<i>73</i>
2.2.2 <i>Výběr materiálu pro nanovláknenné vrstvy</i>	<i>77</i>
a) <i>Výběr materiálu na základě kolonizovatelnosti povrchu</i>	<i>77</i>
b) <i>Výběr materiálu na základě měření bioaktivity biofilmu (měřením respirace)</i>	<i>78</i>
c) <i>Výběr materiálu na základě hodnocení stability nanovláknenného pokryvu</i>	<i>79</i>
d) <i>Výběr materiálu na základě hodnocení testů sorpce</i>	<i>79</i>
2.2.3 <i>Stanovení ideálního množství nanovláknenné vrstvy</i>	<i>81</i>
2.2.4 <i>Testy dezintegrace nanovláken</i>	<i>82</i>
a) <i>Hodnocení stability nanovláken přímou metodou pomocí fluorescenčního mikroskopu</i>	<i>83</i>
b) <i>Hodnocení odtržených nanovláken pomocí filtrace a fluorescenčního mikroskopu</i>	<i>83</i>
c) <i>Hodnocení odtržených nanovláken pomocí textilního barviva</i>	<i>84</i>
2.2.5 <i>Testy toxicity</i>	<i>86</i>
Část testů hodnocení ekotoxicity – Aerovaný vzorek	87
Část testů hodnocení ekotoxicity – Odvážení nanovláken	87
2.2.6 <i>Testy oplachu nosiče vodou a chrom-sírovou směsí</i>	<i>88</i>
2.2.7 <i>Kolonizace nosiče, sledování vývoje biofilmu</i>	<i>89</i>
a) <i>Krátkodobá kultivace nosiče (kolonizace)</i>	<i>89</i>
b) <i>Dlouhodobá kultivace nosiče (kolonizace)</i>	<i>90</i>
c) <i>Několikanásobná rekolonizace nosiče</i>	<i>92</i>
2.2.8 <i>Měření hustoty komplexu po nárůstu biomasy</i>	<i>94</i>
2.2.9 <i>Měření bioaktivity biofilmu</i>	<i>96</i>
3. OVĚŘENÍ NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE NA REÁLNÝCH ODPADNÍCH VODÁCH	98
3.1. <i>Porovnání fluidních a fixních nanovláknenných nosičů biomasy</i>	<i>98</i>
a) <i>Fixní nosiče biomasy</i>	<i>98</i>
1. <i>Měření sušiny</i>	<i>99</i>
2. <i>Respirace fixních nosičů</i>	<i>99</i>
b) <i>Fluidní nosiče biomasy</i>	<i>100</i>
1. <i>Měření sušiny</i>	<i>101</i>
2. <i>Měření respirace fluidních nosičů</i>	<i>102</i>
3.2. <i>Anilin, kyanidy a DPG</i>	<i>105</i>
3.3. <i>Fenoly, kresoly</i>	<i>108</i>
3.4. <i>Chloramin B</i>	<i>114</i>
4. OBRAZOVÁ ANALÝZA BIOFILMOVÝCH STRUKTUR	118
4.1. <i>Snímání obrazu</i>	<i>119</i>
4.2. <i>Před-zpracování a vylepšení obrazu</i>	<i>120</i>
4.2.1. <i>Korekce pozadí</i>	<i>120</i>
4.2.2. <i>Korekce objektů v obraze</i>	<i>121</i>
4.2.3. <i>Komprese obrazu</i>	<i>121</i>
4.3. <i>Segmentace obrazu</i>	<i>124</i>
4.3.1. <i>Segmentace podkladového materiálu (nosiče) v obraze</i>	<i>124</i>
4.3.2. <i>Segmentace biofilmu v obraze</i>	<i>125</i>
1. <i>Segmentace přímým prahováním, metodou Otsu</i>	<i>125</i>
2. <i>Segmentace převedením do CIELAB barevného prostoru</i>	<i>126</i>
3. <i>Segmentace převedením do HSV barevného prostoru</i>	<i>128</i>
4.4. <i>Morfologické zpracování obrazu</i>	<i>132</i>
4.5. <i>Charakterizace a identifikace oblastí</i>	<i>132</i>

4.5.1.	Plošné parametry	133
1)	Počet objektů	134
2)	Plošné zaplnění nosiče (plošná porozita nosiče)	135
3)	Porozita objektu a Eulerovo číslo	137
4)	Obvod	139
5)	Obsah	140
6)	Orientace	143
7)	Kruhovitost	144
8)	Difuzní vzdálenost	146
9)	Fraktální dimenze	149
10)	Další hodnocené parametry	151
4.5.2.	Texturní parametry	152
1)	Texturní entropie	152
2)	Energie a Homogenita	154
4.6.	Korelace obrazového hodnocení s laboratorními metodami	155
G	ZÁVĚR	158
	<i>Doporučení na pokračování práce v daném tématu</i>	<i>159</i>
H	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ STUDENTA	160
a)	<i>Impaktované a recenzované články</i>	<i>160</i>
b)	<i>Ověřené technologie</i>	<i>160</i>
c)	<i>Články ve Scopus nebo Web of Knowledge databázi</i>	<i>161</i>
d)	<i>Vystoupení na konferencích a další publikace</i>	<i>161</i>
I	SEZNAM POUŽÍVANÉ LITERATURY	163
Příloha A – HODNOCENÍ TOXICITY	170	
a)	Výsledky měření toxicity – Aerovaný vzorek	170
b)	Výsledky měření toxicity – Odvážení nanovláken	171
Příloha B – DOPROVODNÁ MĚŘENÍ REKOLONIZACE	174	
a)	Výsledky měření rekolonizace – CHSK	174
b)	Výsledky měření rekolonizace – Optická densita	175
c)	Výsledky měření rekolonizace – pH	175
d)	Výsledky měření rekolonizace – Salinita	176
Příloha C – DOPROVODNÁ MĚŘENÍ POROVNÁNÍ NOSIČŮ	177	
a1)	Výsledky měření fixních nosičů – CHSK	177
b1)	Výsledky měření fixních nosičů – Optická densita	177
c1)	Výsledky měření fixních nosičů – pH	177
a2)	Výsledky měření fluidních nosičů – vstupní zatížení reaktorů	177
b2)	Výsledky měření fluidních nosičů – výstupní CHSK	178
c2)	Výsledky měření fluidních nosičů – Optická densita	178
d2)	Výsledky měření fluidních nosičů – pH	179
Příloha D – DALŠÍ CHARAKTERISTIKY PŘI ANALÝZE BIOFILMU	180	
10)	Horizontální a vertikální běhová délka	180
11)	Ekvivalentní průměr kruhu	181
12)	Solidita	182

Seznam zkratk a symbolů

BČOV	...	biologická čistírna odpadních vod, biologické čištění odpadních vod
CIELAB	...	barevný prostor (Commission Internationale de l'Eclairage LAB, kde L je měrná světlost, složky a^* , b^* jsou chromatické osy)
ČOV	...	čistírna odpadních vod
DD	...	difuzní distance (vzdálenost) [px]
DPG	...	difenylguanidin
dtex	...	jednotka užívaná v textilním průmyslu pro jemnost přize, představuje délkovou hustotu, konkrétně hmotnost 1 kilometru přize v gramech
EPS	...	extracelulární polymerní látky (extracellular polymeric substance)
EqD	...	ekvivalentní průměr kruhu [px]
HDB	...	horizontální délka běhu [px]
HSB	...	barevný prostor (Hue, Saturation, Brightness)
HSV	...	barevný prostor (Hue, Saturation, Value)
CHSK	...	chemická spotřeba kyslíku [mg/l]
K3	...	typ nosiče AnoxKaldnes (obsahující 3 mezikruží)
LCK	...	označení kyvetových testů Hach-Lange (typ testu)
OV	...	odpadní vody
PES	...	polyethersulfon,
PVA	...	polyvinylalkohol,
PVB	...	polyvinyl butyral,
PUR	...	polyuretan
pH	...	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů ve zředěném vodném roztoku
px	...	pixel (obrazový bod)
RGB	...	barevný prostor (red, green, blue)
r_v	...	objemová respirační rychlost [mg/l.hod]
r_x	...	specifická respirační rychlost [g/g.den]
V	...	objem [l, m ³]
VDB	...	vertikální délka běhu [px]
X	...	sušina biomasy [g]

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Znázornění vývoje biofilmu (Singh et al. 2006).....	25
Obrázek 2 – Vliv vnějších podmínek na formaci biofilmu (Loosdrecht et al. 1995).....	26
Obrázek 3 – Různé faktory ovlivňující strukturu biofilmu a jejich vztah (Loosdrecht et al. 1995).....	26
Obrázek 4 – Nosiče AnoxKaldnes, zleva K1, K3, BiofilmChip™ M, BiofilmChip™ P a F3 (Le Noir, 2011; AnoxKaldnes™ MBBR)	32
Obrázek 5 – Komerční nosič AnoxKaldnes™ MBBR (nový a použitý nosič, detail kolonizace nosiče K3)	33
Obrázek 6 – Pleteninový nosič biomasy, smyčkový (Komberec, 2011)	33
Obrázek 7 – Pleteninový nosič biomasy, válcový (Komberec, 2011)	34

Obrázek 8 – Pleteninový nosič biomasy, plochý (Komberec, 2011).....	34
Obrázek 9 – Nosič biomasy z netkané textilie, válcový (Komberec, 2011)	34
Obrázek 10 – Nosič biomasy tkaninový, pásový (Komberec, 2011).....	35
Obrázek 11 – Nosič biomasy kombinovaný z plastu a netkané textilie, válcový (Komberec, 2011)	35
Obrázek 12 – Nosič biomasy textilní, bambule (Komberec, 2011).....	35
Obrázek 13 – Nosič biomasy textilní, umělá tráva (Komberec, 2011).....	36
Obrázek 14 – Nosič biomasy kombinovaný z plastu a textilie, válcový (Komberec, 2011)	36
Obrázek 15 – Barevná reprezentace modelu RGB (Pospíšilová a Roušarová, 2010).....	39
Obrázek 16 – Reprezentace modelu CIELAB (Pospíšilová a Roušarová, 2010)	40
Obrázek 17 – Trojúhelníková a kuželová reprezentace HSV modelu (HSV barevný prostor, 2013)	41
Obrázek 18 – Příklad histogramu obrazu a volby ideální prahové hodnoty.....	42
Obrázek 19 – Charakterizace 4-připojení a 8-připojení pixelů (4-connected nebo 8-connected)	43
Obrázek 20 – Příklad komponentního značení (component labelling) v Matlabu	43
Obrázek 21 – Příklad shlukovacího algoritmu K-Means v Matlabu	44
Obrázek 22 – Znázornění výpočtu parametru obvodu a obsahu v prostředí Matlab (Matlab 2013).....	45
Obrázek 23 – Matice výpočtu horizontální a vertikální délky běhu a dané znázornění v buněčném shluku (Yang et al., 2000)	46
Obrázek 24 – Znázornění výpočtu parametru orientace v prostředí Matlab (Matlab 2013)	46
Obrázek 25 – Znázornění shluku buněk (difuzní vzdálenost (D_D), horizontální délka běhu (HRL), vertikální délka běhu (VRL) dle (Yang et al., 2000).....	47
Obrázek 26 - Dilatace pomocí dilatačních kruhů různých průměrů (Yang et al., 2000)	48
Obrázek 27 – Příklad grafu fraktální dimenze pro 3D obraz (Hermanowicz et al. 1995)	48
Obrázek 28 – Příklad konvexní obálky objektů (Matlab, 2013).....	49
Obrázek 29 – Příklad maticového znázornění biofilmu 4 x 4 se čtyřmi hodnotami škály šedé (0 – 3), vstup pro matici prostorové závislosti (Yang et al., 2000; Lewandowski 2007)	50
Obrázek 30 – Náhodně generovaný obraz pro přehled texturních parametrů obrazu, a) prázdný obraz, b) jeden kruhový objekt v obraze, c) dva kruhové objekty v obraze, d) mnoho objektů v obraze (Lewandowski and Beyenal, 2007)	52
Obrázek 31 – Respirometrická cela, komerční a nanovláknenné nosiče; Příklad průběhu respirace	60
Obrázek 32 – Detail nanovláknenné vrstvy ukotvené na vyvíjené niti pro různá měřítka	62
Obrázek 33 – Laboratorní sestavení experimentu (bioreaktor, čerpadlo, zachytávací nádrž, aerátor)	63
Obrázek 34 – Příklad fluidního nosiče a mechanismus ukotvení do pevného rámu	63
Obrázek 35 – Dokumentace kolonizovaného nosiče (20 hodin kultivace). Detail nosiče porůstajícího biofilmem a zachycení prvních solných inkrust (pořízeno na pracovišti Zeiss, Německo).....	67
Obrázek 36 – Dokumentace kolonizovaného nosiče (pořízeno na pracovišti Zeiss, Německo).....	67
Obrázek 37 – Dokumentace vývoje kolonizace nanovláknenného nosiče pomocí elektronového mikroskopu (140, 160, 210 a 330 hodin). Dokumentace narůstání bakteriálního biofilmu na/v nanovláknenných vrstvách (resp. uvnitř nosiče). (pořízeno na VŠCHT Praha).....	67
Obrázek 38 – Fotografická dokumentace vývoje biofilmu na nanovláknenném nosičích (1, 5, 10, 15 den). Po delší době kolonizace se mikrobiální biomasa přirozeně rozroste i na místa bez nanovláken.....	67
Obrázek 39 – Přehled vývoje nanovláknenné nitě (vzorek A – E)	69
Obrázek 40 – Fixní nosič – Zátěžná pletenina, nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)	70
Obrázek 41 – Fixní nosič – Zátěžná pletenina, 4x skaná nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)	70
Obrázek 42 – Fixní nosič – Tkanina, perlinková vazba, nit s nánosem pojiva, nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010).....	70
Obrázek 43 – Fixní nosič – Pletenina, osnova s vloženým útkem, řetízek PE, nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)	71
Obrázek 44 – Fixní nosič – Pletenina, osnova s vloženým útkem, řetízek PE, 4x skaná nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)	71
Obrázek 45 – 3D simulace návrhu technologie vyjímatelných nosných rámců (Lederer, 2011)	72
Obrázek 46 – Náčrty technologie vyjímatelných nosných rámců (nárys, bokorys, půdorys, Lederer, 2011).....	72
Obrázek 47 – Reálná konstrukce technologie vyjímatelných rámců (Lederer, 2011).....	72
Obrázek 48 – Příklad fluidních nosičů („bambule, třikrát typ „soudky“, „mašličky“).....	73
Obrázek 49 – Nosiče zvolené pro laboratorní testování účinnosti čištění odpadních vod	73
Obrázek 50 – Návrhy soudkovitých typů nosiče (varianta I., varianta II. a varianta III.)	75

Obrázek 51 – Návrh uzlíkových typů nosiče	75
Obrázek 52 – Návrh kónických typů nosiče (varianta mašlička, varianta bambule).....	76
Obrázek 53 – Časový vývoj růstu biofilmu na různých typech nano-vláken (různé materiály polymeru)	77
Obrázek 54 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích PES (1, 7, 21, 35 den kolonizace)	78
Obrázek 55 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích PUR (1, 7, 21, 35 den kolonizace).....	78
Obrázek 56 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích PVB (1, 7, 21, 35 den kolonizace)	78
Obrázek 57 – Polyethersulfonová (PES) nanovlákná s fixací; 0, 7, 14, 21 den sledování dezintegrace	79
Obrázek 58 – Polyvinyl butyralová (PVB) nanovlákná s fixací; 0, 7, 14, 21 den sledování dezintegrace	79
Obrázek 59 – Polyuretanová (PUR) nanovlákná s fixací; 0, 7, 14, 21 den sledování dezintegrace	79
Obrázek 60 – Sorpce pro různé povrstvení nanovlákná a sorpce pro komerční nosič	80
Obrázek 61 – Sorpce pro různé materiály pokryvu nosné nitě nanovlákná	80
Obrázek 62 – Časový vývoj růstu biofilmu na různých typech nano-nosičů (různé povrstvení).....	81
Obrázek 63 – Fotografie časového vývoje růstu biofilmu pro nanovlákný nosič Nános 2 (50 dtex)	82
Obrázek 64 – Detail nanovrstvy před aplikací a po sedmém a patnáctém dni vlivu střížných sil na nosič	83
Obrázek 65 – Snímkování povrchu membránového filtru pod fluorescenčním mikroskopem (voda byla filtrována po 15.dni experimentu dezintegrace)	84
Obrázek 66 – Snímkování povrchu membránového filtru optickým mikroskopem	84
Obrázek 67 – Počet vláken na filtru z délky 75 m nitě do 1 l vody	85
Obrázek 68 – Kolonizovaný nosič před oplachem (s biofilmem); Test oplachu nosiče vodou a chrom-sírovou směsí (mikroorganismy jsou na obrázku zbarveny lehce žluto-hnědě)	88
Obrázek 69 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích (krátkodobá kultivace)	89
Obrázek 70 – Fotodokumentace časového vývoje růstu biofilmu na nosiči AnoxKaldnes (nový)	90
Obrázek 71 – Fotodokumentace časového vývoje růstu biofilmu na nosiči AnoxKaldnes (již jednou kolonizovaný)	90
Obrázek 72 – Fotodokumentace časového vývoje růstu biofilmu na nosiči PES (bez nanovrstvy)	90
Obrázek 73 – Fotodokumentace časového vývoje růstu biofilmu na nosiči PES (s nanovrstvou)	90
Obrázek 74 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích (dlouhodobá kultivace)	91
Obrázek 75 – Obrazová dokumentace vzorků pro stý den kultivace (AnoxKaldnes, Nanovlákná 50 dtex, Nanovlákná 100 dtex)	92
Obrázek 76 – a) Mechanismus ukotvení nití do pevného rámu, b) Pevný rám s nosiči, po jednom měsíci kolonizace, c) Sestavení laboratorního modelu	92
Obrázek 77 – Časový průběh nárůstu biofilmu pro testy rekolonizace	93
Obrázek 78 – Příklad zbytkového biofilmu na nosiči po druhém a třetím cyklu re-kolonizace (po oplachu). Žluto-hnědé plochy naznačují místa nedobře omyté nitě (zbytek usadlého biofilmu).	93
Obrázek 79 – Snímek nosiče biomasy v odměrném válci při testech sedimentace, téměř jeden rok kolonizovaný nosič (detaily nosiče).	95
Obrázek 80 – Sestavení laboratorních reaktorů s fixními nosiči biomasy	98
Obrázek 81 – Sušina vázaných mikroorganismů na fixních nanovlákných nosičích	99
Obrázek 82 – Sušina vázaných mikroorganismů na fixních nanovlákných nosičích	99
Obrázek 83 – Objemová respirační rychlost (mikroorganismy na nosiči) fixních nanovlákných nosičů	100
Obrázek 84 – Specifická respirační rychlost (mikroorganismy na nosiči) fixních nanovlákných nosičů	100
Obrázek 85 – Nosiče zvolené pro laboratorní testování účinnosti čištění odpadní vody (sud tlustý – I. pletenina; sud tenký – II. pletenina; mašle – I. pletenina).....	100
Obrázek 86 – Sestavení laboratorních reaktorů s fluidními nosiči	101
Obrázek 87 – Sušina vázaných mikroorganismů na fluidních nanovlákných nosičích	101
Obrázek 88 – Vyhodnocení sušiny dispergovaných mikroorganismů přepočtem z CHSK	101
Obrázek 89 – Objemová respirační rychlost fluidních nanovlákných nosičů (mikroorganismy na nosiči + voda z daného reaktoru s mikroorganismy).	102
Obrázek 90 – Objemová respirační rychlost fluidních nanovlákných nosičů (voda z daného reaktoru s mikroorganismy).	102
Obrázek 91 – Objemová respirační rychlost (mikroorganismy na nosiči) fluidních nanovlákných nosičů	103
Obrázek 92 – Specifická respirační rychlost (mikroorganismy na nosiči) fluidních nanovlákných nosičů	103
Obrázek 93 – Grafy porovnání fluidních a fixních nosičů (sušina, specifická respirace)	104
Obrázek 94 – Vstupní (nastavované) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené anilinem	105
Obrázek 95 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené anilinem	106
Obrázek 96 – Výstupní parametry reaktoru AnoxKaldnes – absorbance, měrná elektrická vodivost (reálné odpadní vody zatížené fenolem)	106

Obrázek 97 – Výstupní parametry nanovláknenného reaktoru – absorbance, měrná elektrická vodivost (reálné odpadní vody zatížené fenolem)	106
Obrázek 98 – Výstupní parametry AnoxKaldnes reaktoru – pH, rozpuštěný O ₂ (reálné odpadní vody zatížené fenolem).....	107
Obrázek 99 – Výstupní parametry nanovláknenného reaktoru – pH, rozpuštěný O ₂ (reálné odpadní vody zatížené fenolem).....	107
Obrázek 100 – Závislost účinnosti čištění odpadní vody na průtoku a teplotě (reálné odpadní vody zatížené anilinem)	107
Obrázek 101 – Vstupní (nastavované) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené fenolem	108
Obrázek 102 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené fenolem	109
Obrázek 103 – Výstupní parametry reaktoru nosiče AnoxKaldnes – CHSK, celkové fenoly (reálné odpadní vody zatížené fenolem)	109
Obrázek 104 – Výstupní parametry reaktoru s nanovláknenným nosičem – CHSK, celkové fenoly (reálné odpadní vody zatížené fenolem).....	109
Obrázek 105 – Závislost účinnosti čištění odpadní vody na průtoku a teplotě (reálné odpadní vody zatížené fenolem).....	110
Obrázek 106 – Výstupní parametry reaktorů – absorbance a měrná elektrická vodivost (reálné odpadní vody zatížené fenolem)	110
Obrázek 107 – Výstupní parametry reaktorů – pH a rozpuštěný kyslík (reálné odpadní vody zatížené fenolem)	110
Obrázek 108 – Tvorba solných inkrust na nosiči AnoxKaldnes a na nanovláknenném nosiči (pro reálné odpadní vody zatížené fenolem).....	111
Obrázek 109 – Proces těkání kontaminantů (reálné odpadní vody zatížené fenolem)	112
Obrázek 110 – Sušina a obrazové hodnocení nosičů (pro reálné odpadní vody zatížené fenolem)	113
Obrázek 111 – Snímky vývoje biofilmu v průběhu experimentu pro AnoxKaldnes a nanovláknenný nosič	113
Obrázek 112 – Vstupní (nastavované) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B	114
Obrázek 113 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B – výstupní CHSK, měrná elektrická vodivost.....	114
Obrázek 114 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B – výstupní CHSK, látkové zatížení.	115
Obrázek 115 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B – teplota, rozpuštěný kyslík, pH.....	115
Obrázek 116 – Biofilm na vyjímatelných nosných rámech, detail biofilmu v mokřím a suchém stavu (pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B v laboratorních podmínkách)	115
Obrázek 117 – Zachycení poslední fáze kolonizace nosiče, rozdíl mezi použitím nanovláknenné nitě typu 50 dtex (vlevo) a 100 dtex (vpravo), pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B.	116
Obrázek 118 – Detail reaktoru (přichycení mikroorganismů na nosičích, vlevo 50 dtex, vpravo 100 dtex) pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B.	116
Obrázek 119 – a) Reálná aplikace na ČOV Bochemie a.s. Bohumín, technologie vyjímatelných nosných rámců; b) Detail nanovláknenné pleteniny. (Lederer, 2011)	116
Obrázek 120 – a) Pletenina ihned po aplikaci na ČOV Bochemie a.s. Bohumín, před kolonizací; b) Pletenina po jednom roce běhu čistírny. (Lederer, 2011)	117
Obrázek 121 – Příklad korekce pozadí v obraze, obraz před a po zpracování v externím programu	120
Obrázek 122 – Příklad korekce halo-efektu v obraze, obraz před a po zpracování v externím programu	121
Obrázek 123 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – plošné zaplnění.....	122
Obrázek 124 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – porositá objektu	122
Obrázek 125 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – obsah objektu	122
Obrázek 126 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – difuzivita objektu	122
Obrázek 127 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – energie.....	123
Obrázek 128 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – fraktální dimenze.....	123
Obrázek 129 – Příklad detekce nosiče v obraze pro plastový komerční nosič AnoxKaldnes (vpravo bílá oblast odpovídá detekovanému nosiči).....	125
Obrázek 130 – Příklad detekce nanovláknenného nosiče v obraze (vpravo bílá oblast odpovídá detekovanému nosiči).....	125
Obrázek 131 – Kalibrace snímků škály barev (červená označuje oblasti, které budou hodnoceny)	126
Obrázek 132 – Příklad detekce biofilmu daným algoritmem (červená značí detekované oblasti biofilmu)	126

Obrázek 133 – a) Příklad shlukovacího algoritmu K-Means v CIELAB barevném prostoru, ukázka K-Means algoritmu (černá = pozadí, bílá = nosič, šedá = biofilm); b) Shluk reprezentující biofilm na nosiči v separovaném obraze.	127
Obrázek 134 – a) Vstupní, původní obraz určený k detekci; b) Původní obraz transformovaný do barevného prostoru CIELAB; c) Příklad shlukovacího algoritmu K-Means v CIELAB barevném prostoru, ukázka chybného začlenění oblastí do daných shluků; d) Chybně detekovaný biofilm v obraze, detekován je i podložní nosič.	127
Obrázek 135 – Segmentace převedením do CIELAB; a) Původní obraz, b) Ideální detekce biofilmu, c) Detekovaný biofilm v CIELAB barevném prostoru (příklad chybné detekce)	128
Obrázek 136 – Vstupní, původní RGB obraz a obraz převedený do HSV barevného prostoru pro nanovláknenný a komerční nosič biomasy	128
Obrázek 137 – Separované vrstvy obrazu v HSV prostoru (zleva postupně vrstvy H, S, V)	129
Obrázek 138 – Separované vrstvy obrazu v HSV prostoru pro nanovláknenný nosič a) Znázorněný prahovaný rozdíl {S vrstva – prahovaná vrstva H taková že $(0.2 \leq f_{(H)} \leq 0.7)$ }; b) Výsledný detekovaný biofilm	129
Obrázek 139 – Separované vrstvy obrazu v HSV prostoru pro komerční nosič a) Znázorněný prahovaný rozdíl {S vrstva – prahovaná vrstva H taková že $(0.2 \leq f(H) \leq 0.7)$ }; b) Výsledný detekovaný biofilm	129
Obrázek 140 – a) Vrstva S bez úpravy, b) Vrstva {S-H*}, po úpravě odstranění nežádoucích vláken	130
Obrázek 141 – a) Původní obraz; b) Ideální detekce biofilmu; c) Detekovaný biofilm v HSV barevném prostoru	130
Obrázek 142 – Rozdíl v přístupu hodnocení v CIELAB a HSV barevném prostoru	131
Obrázek 143 – Příklad identifikace oblastí pomocí navrženého algoritmu v Matlabu pro komerční nosič AnoxKaldnes a pro nanovláknenný nosič	132
Obrázek 144 – Obrazová analýza – Počet objektů	135
Obrázek 145 – Obrazová analýza – Plošné zaplnění	136
Obrázek 146 – Obrazová analýza – Porosita objektů	137
Obrázek 147 – Obrazová analýza – Eulerovo číslo objektů (průměr)	138
Obrázek 148 – Obrazová analýza – Histogram hodnot porozity objektů	138
Obrázek 149 – Obrazová analýza – Histogram hodnot porozity objektů (detail)	139
Obrázek 150 – Obrazová analýza – Obvod objektů (průměr)	140
Obrázek 151 – Obrazová analýza – Histogram hodnot obvodu objektů	140
Obrázek 152 – Obrazová analýza – Obsah objektů (maximum)	142
Obrázek 153 – Obrazová analýza – Obvod objektů (maximum)	142
Obrázek 154 – Obrazová analýza – Obsah objektů (průměr)	142
Obrázek 155 – Obrazová analýza – Obvod objektů (průměr)	142
Obrázek 156 – Obrazová analýza – Histogram hodnot obsahu objektů	143
Obrázek 157 – Náskres horizontální osy snímání u AnoxKaldnes nosiče	143
Obrázek 158 – Náskres horizontální osy snímání u nanovláknenného nosiče	144
Obrázek 159 – Obrazová analýza – Orientace	144
Obrázek 160 – Obrazová analýza – Kruhovitost	145
Obrázek 161 – Obrazová analýza – Histogram hodnot kruhovitosti objektů na nosiči AnoxKaldnes	145
Obrázek 162 – Obrazová analýza – Histogram hodnot kruhovitosti objektů na nanovláknenném nosiči	146
Obrázek 163 – Obrazová analýza – Difuzní vzdálenost (maximum)	147
Obrázek 164 – Obrazová analýza – Difuzní vzdálenost (průměr)	147
Obrázek 165 – Obrazová analýza – Znázornění měření difuzivity vyjádřený jako obraz pro AnoxKaldnes a nanovláknenný nosič (119.den kolonizace)	148
Obrázek 166 – Obrazová analýza – Počet difuzních objektů	149
Obrázek 167 – Obrazová analýza – Histogram hodnot průměrné difuzní vzdálenosti objektů	149
Obrázek 168 – Obrazová analýza – Fraktální dimenze	150
Obrázek 169 – Obrazová analýza – Ukázka výpočtu fraktální dimenze objektů	151
Obrázek 170 – Obrazová analýza – Histogram hodnot fraktální dimenze objektů	151
Obrázek 171 – Obrazová analýza – Texturní entropie	153
Obrázek 172 – Snímky biofilmu na nosiči AnoxKaldnes a na nosiči nanovláknenném, na počátku a na konci kultivace (snímky nebyly zachyceny na stejném místě nosiče)	153
Obrázek 173 – Obrazová analýza – Energie	154
Obrázek 174 – Obrazová analýza – Homogenita	154
Obrázek 175 – Korelace časového průběhu nárůstu biofilmu (průběh kolonizace) a vyjádření sušiny	155

Obrázek 176 – Korelace mezi parametry sušiny a plošného zaplnění biofilmem	156
Obrázek 177 – Kinetika růstu mikroorganismů na nosičích	156
Obrázek 178 - Vstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (vstupní CHSK, objemové zatížení, teplota)	174
Obrázek 179 - Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (výstupní CHSK, teplota)	174
Obrázek 180 - Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (absorbance, teplota).....	175
Obrázek 181 - Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (vstupní CHSK, objemové zatížení, pH)	175
Obrázek 182 - Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (měrná elektrická vodivost, resp. salinita a teplota)	176
Obrázek 183 - Výstupní parametry při ověřování fixních nosičů - absorbance.....	177
Obrázek 184 - Výstupní parametry při ověřování fixních nosičů - pH.....	177
Obrázek 185 – Vstupní parametry při ověřování fluidních nosičů - vstupní CHSK, objemové zatížení, přítok modelové vody	178
Obrázek 186 - Výstupní parametry při ověřování fluidních nosičů - výstupní CHSK	178
Obrázek 187 - Výstupní parametry při ověřování fluidních nosičů - absorbance	179
Obrázek 188 - Výstupní parametry při ověřování fluidních nosičů - pH	179
Obrázek 189 – Obrazová analýza – Vertikální délka běhu (maximum)	180
Obrázek 190 – Obrazová analýza – Horizontální délka běhu (maximum).....	180
Obrázek 191 – Obrazová analýza – Histogram hodnot VDB a HDB běhové délky objektů nosiče AnoxKaldnes	181
Obrázek 192 – Obrazová analýza – Histogram hodnot VDB a HDB běhové délky objektů nanovláknenného nosiče	181
Obrázek 193 – Obrazová analýza – Ekvivalentní průměr kruhu (maximum)	182
Obrázek 194 – Obrazová analýza – Histogram hodnot ekvivalentních průměrů objektů.....	182
Obrázek 195 – Obrazová analýza – Solidita (průměr)	183

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Přehled komerčně dostupných polymerních nosičů biomasy a jejich parametrů (McQuarrie et al., 2011).....	31
Tabulka 2 – Přehled vypočtených texturních parametrů (Lewandowski and Beyenal, 2007)	52
Tabulka 3 – Přehled vyrobených „prototypů“ soudkových nosičů a jejich vlastnosti.	74
Tabulka 4 – Hodnocení bioaktivity biofilmu měřením respirace	78
Tabulka 5 – Počet vláken na filtru při hodnocení dezintegrace	85
Tabulka 6 – Složení zředěvacích roztoků pro testy toxicity.....	86
Tabulka 7 – Hodnocení respirace při testech bioaktivity biofilmu	96
Tabulka 8 – Hodnoty nerozpuštěných látek (113. den provozu, reálné odpadní vody zatížené fenolem)	111
Tabulka 9 – Vypočtené respirační rychlosti (reálné odpadní vody zatížené fenolem).....	111
Tabulka 10 – Přehled charakteristik vstupního a výstupních komprimovaných obrazů	123
Tabulka 11 – Změny rychlosti počtu objektů na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)	135
Tabulka 12 – Změny rychlosti plošného zaplnění na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot).....	136
Tabulka 13 – Změny obvodu objektů na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)	139
Tabulka 14 – Změny obsahu objektů na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)	141
Tabulka 15 – Změny obvodu objektů na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)	141

B ABSTRAKT

Předkládaná disertační práce se zabývá návrhem, vývojem a ověřením polymerního nanovláknenného nosiče, který může být prakticky využíván v hybridních bioreaktorech s imobilizovanou biomasou. V rámci vývoje nanovláknenného nosiče byla pozornost věnována především nosné niti, která musí splňovat náročná hlediska (mechanická, fyzikální a chemická stabilita, kolonizovatelnost, vysoký měrný povrch aj.). Z finální verze nosné nitě byly vytvořeny dva základní typy nanovláknenných nosičů – nosič pro fluidní lože (proudící společně s okolní kapalinou), nosič pro fixní lože (kapalina proudí skrze pevně uchycený nosič). Nanovláknenný nosič poskytuje mnohé výrazné výhody, jakými jsou především jejich velký specifický měrný povrch, vyšší resistance biofilmu vůči vnějšímu toxickému působení a zejména rychlost zapracování nosiče.

Laboratorní ověřování vyvíjeného nanovláknenného nosiče probíhalo na reálných a modelových odpadních vodách. Za přesně stanovených podmínek byly ověřovány základní technologické parametry a identifikovány byly limitní stavy (minimální doba zdržení odpadní vody, maximální a minimální teplota, rozpětí pH, salinity, hodnocení respirace systému aj.). Paralelně jsou vyvíjené nanovláknenné nosiče porovnávány s komerčním nosičem AnoxKaldnes.

K hodnocení procesů upoutávání bakteriálního biofilmu na nosič bylo v disertační práci využito moderní metody obrazového hodnocení. Stanoven byl růst a vývoj biomasy a hodnoceny byly výsledné biofilmové struktury. V rámci disertační práce byla vytvořena ucelená neinvazivní metodika hodnocení imobilizovaných mikrobiálních struktur na podkladovém materiálu (obecně na libovolném nosiči biomasy). Vytvořená metodika byla úspěšně korelována s gravimetrickým stanovením sušiny.

Klíčová slova

Nanovláknenný nosič, průmyslové odpadní vody, nosiče biomasy, imobilizace mikroorganismů, biologické čištění, obrazová analýza biofilmu.

C ABSTRACT

This dissertation covers the design, development, and validation of polymer nanofiber carriers for use in hybrid bioreactors with immobilized biomass. In developing the nanofiber carriers, special attention was paid to the supporting threads, which must meet exacting standards (e.g. mechanical, physical, and chemical stability; colonization possibility; high surface area). Two basic types of nanofiber carriers were developed based on the final version of the threads: a fluidized bed carrier (carrier flows with the surrounding liquid) and a fixed bed carrier (liquid flows through a firmly attached carrier). Nanofiber carriers provide many significant advantages, such as their large specific surface area, high biofilm resistance against external toxic effects and speed of carrier incorporation.

The basic technological parameters of the nanofiber carrier were verified in the laboratory, using both real and model wastewater, and technological limits identified (e.g. minimum wastewater residence time; maximum and minimum temperature and salinity; respiration assessment). At the same time, nanofiber carrier performance was compared with a commercial carrier (AnoxKaldnes).

The latest image analysis methods were used to evaluate immobilized-bacteria biofilm (bacterial biofilm incorporation and formation on the carrier), its growth, and development of biofilm structure. A comprehensive non-invasive methodology was developed for the evaluation of immobilized microbial structures on base materials (i.e. on a biomass carrier). This methodology has been successfully correlated with gravimetric determination of dry matter.

Key words

Nanofiber carrier, industrial wastewater, carrier biomass, microbial immobilization, biodegradation, biofilm image analysis.

D CÍLE A PŘÍNOSY DISERTAČNÍ PRÁCE

Primárním cílem předkládané disertační práce byl vývoj polymerního nanovláknenného nosiče bakteriálního biofilmu pro jeho užití v biologickém čištění odpadních vod. Přínosem vyvíjeného nanovláknenného nosiče je stabilizace (resp. podpoření a intenzifikace) čistírenských procesů. Prostředkem k dosažení tohoto výsledku je zvýšení podílu mikroorganismů v systému, a to díky vysokému specifickému měrnému povrchu nanovláknenných nosičů. Využití nanovláken resp. nanotextilií představuje zcela nový směr při přípravě modifikovaných nosičů. Výhodou je využití původního způsobu přípravy nanovláken a jejich unikátních vlastností v novém směru při biologickém čištění odpadních vod. V rámci disertační práce byla prokázána schopnost nanovláken nést vybrané mikroorganismy za vzniku aktivního biofilmu. Jedná se o způsob unikátní ve světovém měřítku, která může být aplikována v mnoha oblastech čištění odpadních vod, především v průmyslových ČOV (vysoce zatížených vod), a dále i při mnoha dalších aplikacích, kde by kombinace biologických metod s využitím nanotechnologií (ve formě nanovláknenných útvarů) dopomohla k efektivnějším procesům. Výsledky laboratorních experimentů i plnoprovozní aplikace ukázali, že biologické čištění průmyslových odpadních vod v biofilmovém bioreaktoru za pomoci nanovláknenného nosiče je velice vhodnou variantou, jak odstraňovat specifické znečištění (např. anilin, kyanidy, DPG, fenoly, chloramin). Nanovláknenný nosič je velice vhodný podklad, neboť biofilm narůstá několikanásobně vyšší rychlostí a zároveň je více odolný než biofilm na komerčních nosičích. Tento výsledek má zásadní význam jednak při zapracování systému, ale zejména v případech regenerace po mimořádných událostech, které jsou v reálné praxi vysoce pravděpodobným rizikem. Disertační práce je zaměřena směrem, který by měl v budoucnu přinést účinná technologická i ekonomická řešení, která by celé řadě průmyslových podniků pomohla problematiku čištění odpadních vod řešit efektivněji.

Cílem disertační práce byl i vývoj a verifikace příslušné metodiky hodnocení vyvíjeného biofilmu, a to za využití moderních metod analýzy obrazu. Cílem metodiky byla charakterizace biofilmu (růst a vývoj) a jeho strukturních vlastností. V rámci disertační práce byla vytvořena ucelená metodika hodnocení imobilizovaných mikrobiálních struktur, která byla navíc korelována se standardním laboratorním hodnocením biomasy (stanovení sušiny). Přínosem tohoto postupu je využití moderní metody, která je oproti standardním metodikám několikanásobně rychlejší, přesnější a více či méně i objektivnější. Navíc v rámci jednoho měření poskytuje analýza obrazu více výstupních informací (informace nejen o množství biomasy, ale i o jejím charakteru, seskupení aj.), což s sebou přináší jednoznačné přínosy mimo jiné také v rámci pochopení problematiky utváření biofilmu a v poznání toho, jaké parametry prostředí zásadně ovlivňují vývoj biofilmu. Přínosem analýzy obrazu je navíc i neinvazivní charakter tohoto měření, což s sebou přináší výhodu v možnosti znovupoužití odebraného vzorku (měřený vzorek nepodléhá deformacím ani destrukci).

E TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOLOGICKÉ ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD

Zvýšený tlak na kvalitu a ochranu životního prostředí v souvislosti s legislativou EU (stejně tak ČR) se odráží i ve zpřísnujících se legislativních limitech pro kvalitu vypouštěných odpadních vod. Tento tlak se projevuje jak v oblasti komunálních ČOV, tak v případě průmyslových aplikací. Užití konvenčních čistírenských technologií pro čištění specificky znečištěných průmyslových odpadních vod je často omezené nebo vyžaduje specifická řešení. Jednou z vhodných variant je imobilizace biomasy ve formě přirozeného biofilmu na vhodném nosiči s primárním cílem zvýšení koncentrace biologického činitele v systému (Masák 2002). Imobilizace bakteriální populace přináší mnohé výhody. Z hlediska mechanické manipulace jde o snadnou separaci biomasy, snížení zatížení dosazovacích nádrží a jednoduchá manipulace s materiálem. Z mikrobiologického hlediska fixace biomasy zabraňuje vyplavování mikroorganismů a udržuje vysokou koncentraci biomasy v reaktoru. Rozhodující výhoda imobilizace je zásadní pro pomalu rostoucí mikroorganismy (mikroorganismy rozkládající biologicky rozložitelné látky pomalu nebo mikroorganismy, jejichž růstová rychlost je snížena vlivem extrémních fyzikálně-chemických vlastností prostředí). (Masák 2002)

S vyšší koncentrací biomasy souvisí kratší doby zdržení v reaktoru, což umožňuje zakoncentrování pomalu rostoucích mikroorganismů a tvorbu dostatečné difúzní bariéry biofilmu, která snižuje účinky toxických látek a fyzikálně-chemických podmínek. Následně je možné využití menšího potřebného objemu nádrže. Imobilizace také zpravidla zvyšuje odolnost organismů, např. proti teplotním šokům, nepříznivým hodnotám pH či chemickým látkám (Masák 2002).

1.1. Biofilm jako společenství mikroorganismů

Mikroorganismy jsou schopné kolonizovat vše, co je ve styku s bakteriálním médiem (anorganické i organické povrchy). Zcela neprospěšné jsou však v medicínské praxi, jsou příčinou poškození umělých implantátů, na zubech vytvářejí zubní plak, vyskytují se i na kontaktních čočkách. Dále pak například v řekách vytvářejí slizké povrchy kamenů, pokrývají trupy lodí, podílejí se na korozi kovů, ucpávají kanalizační toky aj. Biofilmy mají ovšem i své přednosti, které v mnohém předčí jejich nevýhody, jsou úspěšně využívány především při biologické degradaci toxických látek a čištění odpadních vod. Pro čištění průmyslových a městských odpadních vod jsou běžně využívány biofilmové reaktory (resp. hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou). (Čejková et al. 2005; Jirků et al. 2006; O'Neil et al., 2000).

Akinson (Akinson, 1981) uvádí využití biofilmů při čištění odpadní vody na počátku let 1980. Nicméně, je to jen otázka několika posledních desetiletí, co se biofilmové reaktory staly středem zájmu výzkumných pracovníků v oblasti bioremediace. Četné studie určily složení společenstev přítomných v biofilmu v různých prostředích (Aoi, 2002; Woese and Fox, 1977; Ito, et al. 2002; Chalfie, et al.

1994; Tani, et al., 1995) a rostoucí počet mikroskopických a molekulárních metod umožnilo analýzu prostorových a fylogenetických vlastností mikrobů v komunitě biofilmu. (Singh et al. 2006; Pirk, 2003)

1.2. Přínos imobilizace mikroorganismů v biofilmu

Biofilmový systém je výsledkem složité interakce procesů fyzikálních, fyzikálně chemických a biochemických. Biofilm je složité bakteriální uskupení, které může být tvořeno jedním nebo více druhy mikroorganismů. Biofilmem ovlivňované biologické čištění představuje zdatnou a bezpečnější alternativu k bioremediaci s planktonními mikroorganismy, protože buňky v biofilmu mají větší šanci na přizpůsobení a přežití (zejména v období stresu), jelikož jsou chráněny v rámci matrice. Vzhledem k blízkosti vzájemně výhodných fyzických a fyziologických interakcí mezi organismy v biofilmu, je využívání (degradace) xenobiotik zrychleno, a proto jsou imobilizované biofilmy hojně používány v průmyslových závodech při odbourávání škodlivin. (Decho, 2000; Kaprálek, 1986; O'Neil et al., 2000; Spormann, 2008).

Tvorba biofilmu v systému přináší nesporné výhody: zvýšení koncentrace biomasy v bioreaktoru (navýšení celkové biomasy o biofilm), možnost udržení pomalu rostoucích mikroorganismů (fixace ve struktuře biofilmu), zvýšení rezistence imobilizovaných mikroorganismů (díky extracelulárním polymerním látkám, EPS), využití bakteriální populace s jinou strukturou (odlišná struktura buněčné stěny, koncentrační spád uvnitř biofilmu), (Hrdinová, 2006). Další výhodou je, že živiny mají tendenci se soustředit na povrchu materiálu, takže jejich dostupnost je mnohem jednodušší; ochrana proti predaci a vnějším prostředí; také dochází ke sdružování zdrojů (především enzymy), z různých bakteriálních druhů v biofilmu. Nevýhodami pak mohou být například: toxický odpad se může akumulovat uvnitř biofilmu; přístup kyslíku, vody a živin může být omezen. (Babu, 2007)

Kombinace imobilizované a suspenzní biomasy přináší další technologické přínosy: zvýšení koncentrace biomasy umožňuje zkrácení doby zdržení čištěné odpadní vody (resp. zvýšení průtoku), snížení objemů bioreaktorů a tím snížení stáří kalu suspenzní populace. Snížením stáří kalu dojde ke zvýšení specifické aktivity kalu, zvýšení organického podílu (snížení minerálního podílu), snížení koncentrace kalu a následně snížení látkového zatížení dosazovacích nádrží. Tím je umožněno zvýšit objemové zatížení systému jako celku (nižší doby zdržení v bioreaktoru i dosazovací nádrži). Využitím specifických biodegradačních mikroorganismů je možné dosáhnout odstranění i neobvyklého specifického znečištění (např. kyanidů, persistentních organických polutantů apod.) a to i ve vysokých koncentracích. (Čech a Chudoba, 1988; Kaprálek, 1986)

V předkládané disertační práci je pozornost věnována bakteriálním populacím, které jsou schopny přirozeně vytvářet biofilm a které jsou selektovány tak, že jejich aktivita degradovat široké spektrum polutantů je maximální.

1.3. *Rhodococcus erythropolis*

Rhodococcus je rod aerobní, nesporulující, nepohyblivé Gram-pozitivní bakterie, obecně se vyznačující vysokou aktivitou enzymů (van der Geize and Dijkhuizen, 2004; Burkovski, 2008; Martínková et al., 2009). Několik druhů je patogenních, ale většinou jsou benigní. *Rhodococcus* disponuje poměrně rychlým růstem a jednoduchým vývojovým cyklem (McLeod et al., 2006), navíc disponuje širokým metabolickým potenciálem, který má schopnost degradovat obrovské množství organických látek zahrnující jedny z nejobtížněji odbouratelných a toxických látek (jako například toluen, naftalen, herbicidy a polychlorované bifenyly), dosahují toho schopností získat pozoruhodnou škálu různých katabolických genů a jejich masivní buněčnou fyziologií. (Larkin et al., 2005; Spormann, 2008). Jedná se o bakteriální kmen, který vyniká hned v několika parametrech. Dosahuje vysoké účinnosti aktivity biologického čištění, je schopen odolávat velkým změnám teploty (10 – 40 °C) a přizpůsobit se extrémní salinitě. *Rhodococcus* se řadí mezi nokardioformní aktinomycety a je běžný v mnoha přírodních společenstvích od půdy až po vodu. Je ideálním kandidátem pro zvýšení bioremediace kontaminovaných ploch a má široké využití v biotransformacích (modifikace steroidů, enantiosektivní syntézy a produkce amidů z nitrilů). Dokáže katabolizovat krátké i dlouhé alkanové řetězce, aromatické (halogenované, nitrované aj.), heterocyklické a polycyklické sloučeniny. (Larkin et al., 2005) Kromě řady metabolických aktivit má *Rhodococcus erythropolis* ve srovnání s jinými bakteriemi lepší schopnost tvorby biofilmu. (Pospíšilová et al., 2010).

Rhodococcus erythropolis, přesněji kmen CCM 2595 IN byl selektována na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, Ústav biotechnologie (původně Ústav kvasné chemie a bioinženýrství).

1.4. Základní struktura a vlastnosti biofilmu

Finální formaci bakteriálního biofilmu, resp. jeho strukturu, regulují různé faktory životního prostředí. Jsou to především změny v pH, dostupnosti živin, kyslíku a koncentrace bakteriálních metabolitů. Všechny podmínky prostředí způsobují, že se biofilmy od sebe odlišují (Singh et al. 2006). Struktura biofilmu je ovlivňována látkovým zatížením a také hydrodynamickými podmínkami u povrchu biofilmu (což závisí na typu reaktoru). Struktura biofilmu je ovlivněna typem organismu či skupinou mikroorganismů (Gjaltema et al. 1994). Jelikož všechna tato hlediska nejsou často zcela jasně popsána, je velice obtížné porovnávat jednotlivé výsledky různých studií (Loosdrecht et al. 1995).

1. Koncentrace biomasy v biofilmu

Koncentrace biomasy v biofilmu je množství biomasy vztažené na objem biofilmu (nikoli na objem reaktoru). Řádově dosahuje hodnot několika desítek až 100 kg/m³, konkrétně silně závisí na typu a morfologii biofilmu. Koncentrace biomasy v biofilmu značně závisí na jeho tloušťce (Hoehn 1973). Nejvyšší hodnoty dosahuje právě pro biofilmy, jejichž tloušťka nepřesahuje tloušťku aktivního biofilmu (část biofilmu, která je penetrována kyslíkem).

Růst biofilmu je výsledkem přenosu živin ze substrátu a následné přeměny této hmoty biofilmem. Výsledná struktura biofilmu bude záviset na transportní rychlosti omezujícího substrátu, výnosu

biomasy a na hustotě biomasy v biofilmu. Výsledný biofilm, který se formuje rychleji, bude méně hustý. (Tijhuis et al. 1994a; Bishop et al. 1995). Hustota biofilmů souvisí s typem přítomných organismů a velký vliv mají hydrodynamické podmínky. Ukázalo se, že hustota čisté kultury biofilmu se zvyšuje s rostoucími střížnými silami na biofilm. Přesný mechanismus tohoto pozorování však stále chybí. (Loosdrecht et al. 1995; Brent and Peyton, 1996; Lewandowski and Beyenal, 2007)

2. Fimbrie a výčnělky biofilmu

Vlastnosti povrchu buněk, konkrétně přítomnost fimbrií (jemné vláknité výrůstky), bičíků a povrchově souvisejících polysacharidů nebo bílkovin, jsou důležité pro uchycení buňky k povrchu a mohou poskytnout konkurenční výhodu. (Singh et al. 2006)

Na stavbě biofilmu se podílejí mnohé faktory (vlastnosti kolonizovaného povrchu, dostupnost nutrientů, aktivita mikroorganismů, hydrodynamické síly). Za předpokladu, že růst biofilmu započne ze základního filmu výčnělky, znamená to, že v závislosti na smykových podmínkách získávají výčnělky šanci dorůst do makroskopických rozměrů. Z biofilmu za podmínek nízkého látkového zatížení nebo z biofilmu sestávajícího se z pomalu rostoucích organismů, budou výčnělky erodovat dříve než by mohly dosáhnout makroskopické rozměrů; což vede k vytvoření hladkého biofilmu. Na druhou stranu, pokud je smyková síla nízká, biofilm vyrůstá do heterogenní porézní struktury. Tento následek nakonec vede k destabilizaci a k odpadávání biofilmu. Hustota biofilmu je závislá na době zdržení biomasy v aktivní vrstvě. (Loosdrecht et al. 1995)

3. EPS

Mikroorganismy žijící v biofilmu jsou schopny vytvářet extracelulární polymerní látky (extracellular polymeric substance, EPS). Jde o ochrannou a funkční část, která udržuje buňky pohromadě a podílí se na adhezi ke kolonizovanému povrchu. Složení EPS je různé, obsahuje proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny, lipidy, kde koncentrace těchto látek se za různých podmínek liší, což mimo jiné ovlivňuje i adhezivní vlastnosti. Mikroorganismy lépe kolonizují a připoutávají se na hydrofobní povrchy (plasty) než na hydrofilní povrchy (sklo). (Čejková et al. 2005; Palmer et al., 2007). Díky mechanické pevnosti poskytované EPS mohou organismy v biofilmu odolávat smykovým silám, nutriční deprivaci, změně pH a zvýšené koncentraci antibiotik (Jefferson, 2004).

4. Tloušťka biofilmu

Většina modelů biofilmových systémů vychází z předpokladu, že k transportu hmoty v biofilmu dochází převážně ve směru kolmém na jeho povrch. Tloušťka biofilmu je rozhodujícím parametrem, který určuje vzdálenost transportu. V reálných biofilmových reaktorech může tloušťka biofilmu přesahovat i 5 mm. Oxických procesů se však nezúčastňuje celá vrstva, ale jen ta část, která je penetrována kyslíkem (aktivní biofilm). Tloušťka aktivního biofilmu se pohybuje v rozmezí 50 až 150 μm . (Chudoba 1991)

Výsledná tloušťka biofilmu i jeho struktura je ovlivňována látkovým zatížením a mechanickým otěrem (v důsledku střížných sil u povrchu biofilmu) či spontánním strháváním biofilmu (v důsledku procesů uvnitř biofilmu), což závisí na typu reaktoru (Gjaltema et al. 1994; Brent and Peyton, 1996).

Pokud je formován hladký biofilm, pak tloušťka biofilmu je závislá především na velikosti střižných sil. Silnější biofilmy budou obecně podstupovat vyšším smykovým silám. Vyšší látkové zatížení bude mít za následek vyšší rychlost růstu biofilmu. Konečná rovnováha mezi rychlostí růstu a rychlostí oddělování povede k rovnováze tloušťky biofilmu, která se bude zvyšovat s rychlostí látkového zatížení a která se bude snižovat s rostoucí rychlostí smykových sil. (Loosdrecht et al. 1995)

Rozvrstvená struktura biofilmu je důsledkem konkurence substrátů v biofilmu. V publikaci (Zhang et al. 1994) bylo poukázáno na to, že soutěžení v biofilmech vyústí do nejednotné prostorové distribuce bakteriálních populací a v metabolicky více aktivní bakterie.

5. Vodní kanálky a doprava hmoty (difuze)

Základní podstatou biofilmu jsou vodní kanálky, jimiž proudí okysličená voda společně s nutrienty, a které zároveň umožňují odvod nežádoucích látek mimo biofilm. Doprava rozpuštěných látek v biofilmu je řízena konvektivní dopravou uvnitř pórů a vodních kanálů a také difuzí v hustších agregátech biofilmu. Biofilmová matrice se jeví jako vysoce mikro-heterogenní, a to díky mnoha mikroprostředím, které v biofilmu koexistují (Horn et al. 2006). Biofilm je z hlediska v něm probíhajících reakcí složitým heterogenním prostředím. Vzhledem k makroskopickým rozměrům biofilmu se v něm budou projevovat transportní jevy v míře daleko větší, než je tomu u mikroskopických vložek aktivovaného kalu. (Stanley and Lazazzera, 2004; Kjelleberg and Molin, 2002)

Základním mechanismem, kterým probíhá transport hmoty v biofilmu je molekulární difúze. Rychlost difúze v biofilmu je zhruba o 20 % nižší než v čisté vodě, ovšem tento poměr se může měnit s molekulovou hmotností, typem a koncentrací dané látky (Onuma 1982; Williamson 1976). V kompaktních vrstvách biofilmu, kde koncentrace biomasy značně překračuje hodnotu 20 kg/m³, dochází ke snížení rychlosti molekulární difúze až na 50 – 60 % hodnot v čisté vodě (Siegrist 1985). Daný jev je ve vnějších vrstvách biofilmu kompenzován rychlejším přenosem hmoty, tzv. vírovou (turbulentní) difuzí (Chudoba 1991).

6. Quorum sensing

Komunikace mezi bakteriemi urychluje celkovou aktivitu uvnitř biofilmu a tím i degradaci polutantů (Čejková et al. 2005). Quorum sensing (schopnost bakterií komunikovat a koordinovat své chování pomocí signálních molekul) upravuje změny ve vyspělých biofilmech tím, že řídí vytváření kanálů a pilířů jako struktur, které zajišťují efektivní dodávku živin do buněk. Quorum sensing (rozhodovací proces využívaný k jednotné reakci) je důležitá schopnost pro agregaci bakterií na povrchu pevných látek, což ovlivňuje vývoj biofilmu v několika směrech, především v usnadnění přilnutí biofilmu k různým povrchům (Singh et al. 2006).

7. Charakter genové exprese

Flexibilní charakter bakteriální genové exprese umožňuje přežití bakteriím v různých prostředích s rychle se měnícími se podmínkami, takže přizpůsobivost umožňuje bakteriím, aby se jim dařilo skutečně téměř všude (Jefferson, 2004). Imobilizace může také změnit aktivitu mikroorganismů,

změnit fyziologii mikroorganismů, zvýšit aktivitu enzymů v buněčné stěně apod. (Masák 2002; Spormann, 2008).

8. Stabilita biofilmu

V reaktorových systémech, kde smykové síly nejsou vysoké (např. skrápěné filtry nebo biorotory) se bude vyvíjet vysoce heterogenní silný biofilm. Jelikož růst biofilmu není řízen aplikací střižných sil, biofilm se rozroste do velkých tloušťek. V těchto reaktorech pravidelně dochází k událostem odumírání. V reaktorech, kde působí velké střižné síly (např. MBBR reaktory), tyto řídí růst biofilmu a tímto způsobem stabilizují celý systém reaktoru. K získání řádného a stabilního biofilmu je proto nutné v reaktoru využívat určitou střižnou sílu. (Loosdrecht et al. 1995; Brent and Peyton, 1996).

Pro biofilmy narůstající na suspendovaných částicích je důležitý další faktor. Růst tloušťky biofilmu je spojen se zvýšením styčné plochy povrchu pro biofilm, v důsledku čehož se sníží celkové zatížení biofilmu, ale zvýší se smykové tření u povrchu biofilmu. Mohlo by se zdát, že tato interakce mezi zatížením, růstem a oddělováním biofilmu vede k obecné stabilitě biofilmu, avšak v reálných fluidních reaktorech tato stabilita nenastane. Rostoucí biofilmy se stávají méně husté směrem do vyšších, více expandujících regionů (ve fluidním loži). V těchto oblastech je hustota částic menší, což vede k menšímu smykovému tření a dalším následkům pro biofilm. V horní části fluidní vrstvy je nutná kontrola mechanismu růstu biofilmu, je třeba zabránit vymývání částic biofilmu, který zde dosahuje velkých výčnělků (velká protuberance či deformace biofilmu). (Loosdrecht et al. 1995)

Mnoho z jevů vyskytujících se v systémech biofilmu lze vysvětlit přijetím modelu, v němž se růst přednostně vyskytuje ve výčnělcích vyčnívajících z povrchu biofilmu. Tento následek je vyvážen smykovými silami. V „ustáleném stavu“ se struktura biofilmu a hustota vyvažuje smykovými silami takovým způsobem, že oddělování je vyváжено růstem. (Loosdrecht et al. 1995)

1.5. Podmínky pro vznik biofilmu a jeho životní cyklus

Samotný biofilm, pokud by měl ideální podmínky k vývoji a růstu, je schopen se množit takřka libovolně. Ovšem je nutné přihlídnout k několika důležitým okolnostem – mechanické oddělování v důsledku střižných sil na povrchu biofilmu způsobených prouděním kapaliny či vzduchu, nebo spontánní uvolňování celého biofilmu v důsledku odumírání prvně přisedlých buněk. Z těchto důvodů je velice důležité, aby mohutnost biofilmu (tloušťka od kolonizovaného povrchu) nebyla příliš vysoká, aby umožňovala prostup kyslíku a živin až k samotné základně biofilmu, ale zároveň aby biofilm nebyl příliš tenký, neboť pak nedojde k zachycení takového množství bakteriální populace, které je potřeba. (Čejková et al. 2005; Jirků et al. 2006; Kaprálek, 1986; Brent and Peyton, 1996).

Na vzniku, vývoji a stabilizaci biofilmu se podílejí následující procesy (Trulear 1982; Bryers 1982):

1. Transport a adsorpce molekul substrátu na povrch nosiče. Jedná se o zákony sorpce, kde v řádech minut dojde k vytvoření souvislé vrstvy. Tato vrstva významně ovlivňuje další procesy, neboť mění vlastnosti původního povrchu nosiče.

2. Transport mikrobiálních buněk k povrchu nosiče (závisí na režimu toku). Rozhodujícími mechanismy jsou molekulární a turbulentní difúze.
3. Zachycení mikroorganismů na povrch a vývoj biofilmu na povrchu nosiče.
4. Částečné uvolňování biofilmu zpět do proudící kapaliny.

Zachycení a růst biofilmu probíhají ve dvou fázích: reverzibilní adsorpce (i), permanentní zachycení a růst biofilmu (ii), (La Motta 1980).

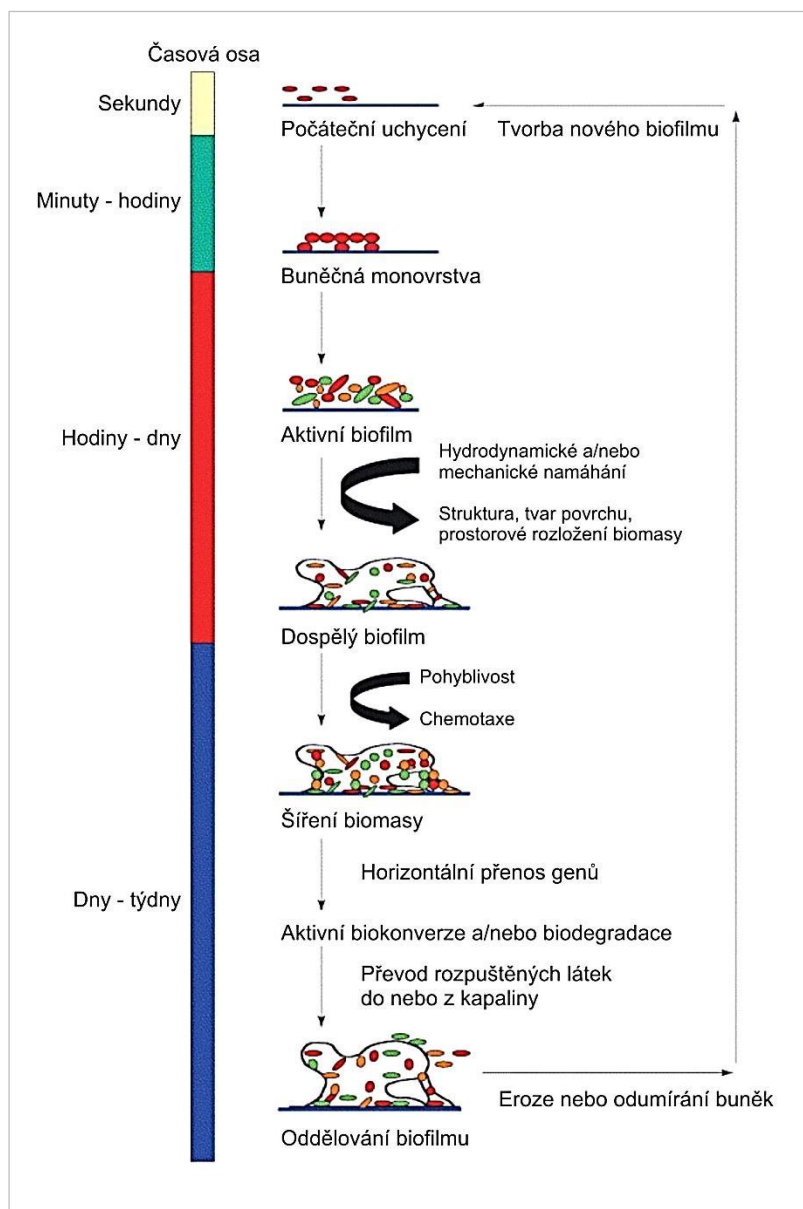
- i. Adsorpce mikroorganismů na povrch nosiče (adsorpční rovnováha) je závislá na fyziologickém stavu kultury. Proces (trvajících řádově hodin) lze popsat Langmuirovou izotermou. Bakterie si zachovávají vlastní aktivní či Brownův pohyb. Tato vrstva buněk však není ještě odolná proti vyplavování při hydraulických režimech v reálných reaktorech. Po prvním uchycení mikroorganismů závisí další vývoj na produkci extracelulárních polymerů.
- ii. Permanentní zachycení je důsledkem tvorby extracelulárních polymerů, které vytvářejí matici, do níž jsou jednotlivé buňky pevně zakotveny. Chemické složení polymerů je závislé na druhu organismu, jsou tvořeny kyselými polysacharidy. Kromě fixace buněk slouží produkce extracelulárních polymerů biofilm tvořícími bakteriemi k vytváření zásob organického uhlíku a energie.

Po určité době se rychlost růstu biofilmu zpomalí a tloušťka biofilmu dosahuje určité ustálené hodnoty. Zpomalení růstu je dáno omezením transportu substrátu do hlubších vrstev biofilmu a zvýšením vlivu odumírání a rozkladu buněk ve stárnoucím biofilmu (La Motta 1980).

Výslednou hodnotu tloušťky biofilmu v ustáleném stavu ovlivňují následující vlivy (Chudoba 1991):

- (1) Zachycování dalších bakterií z proudící kapaliny (relativně zanedbatelný vliv).
- (2) Vlastní růst a množení mikroorganismů a produkce extracelulárních polymerů.
- (3) Odumírání a rozklad buněk.
- (4) Strhávání části biofilmu zpět do proudící kapaliny, což závisí jednak na charakteru biofilmu samého (spontánní strhávání) a jednak na hydraulickém režimu v jeho okolí (mechanický otěr).
 - a) Spontánní strhávání – Pokud je biofilm méně kompaktní, vláknitý, s bohatě členitým povrchem, vyvolávajícím značný odpor proti proudění kapaliny a s tlustou neaktivní vrstvou, jejíž soudržnost může být narušena rozkladem buněk a polymerní matrice.
 - b) Mechanický otěr – Je způsoben prouděním kapaliny okolo biofilmu. Biomasa je z biofilmu strhávána kontinuálně a její ztráty jsou v rovnováze s přírůstkem nové biomasy.

Předpokládá se, že oddělování biomasy z biofilmu se převážně řídí smykovými silami působícími na biofilm. Nicméně, za stejných podmínek smykového tření není oddělování stejné pro rostoucí a nerostoucí biofilmové systémy. Bylo pozorováno, že pokud je do reaktoru pozastaven přichozí substrát a hydrodynamické podmínky jsou nezměněny, pak okamžitě nastává silný pokles v oddělování buněk. (Loosdrecht et al. 1995)

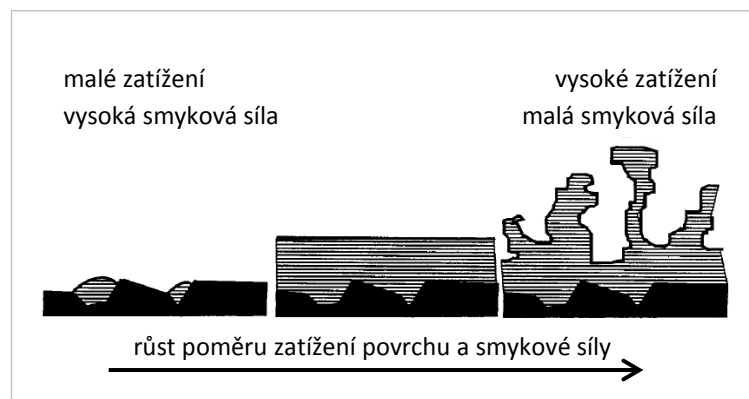


Obrázek 1 – Znázornění vývoje biofilmu (Singh et al. 2006)

Na *obrázku 1* je uvedeno schematické znázornění cyklických kroků podílejících se na tvorbě aktivního biofilmu. Buňky se nejprve připojují pomocí fyzikálně-chemických interakcí nebo díky sekreci proteinů extracelulární hmoty se formují do buněčné monovrstvy, ve které se buňky mohou pohybovat a/nebo se podrobují chemotaxi (pohyb organismu ve směru chemického gradientu). Buňky se v monovrstvě množí a k aktivnímu biofilmu se připojují další buňky. Strukturu biofilmu utvářejí faktory životního prostředí, jako je hydrodynamické a mechanické namáhání. Buňky v dospělém biofilmu jsou stále pohyblivé a podstupují chemotaxi, což vede k dalšímu šíření biomasy a k zvýšené míře horizontálního přenosu genů. Aktivní biokonverze a/nebo biologický rozklad vede k přenosu rozpuštěných látek do nebo z okolní kapaliny, což může mít za následek odpoutávání biofilmu. Procesy formování a oddělování buněk se opakují v cyklu, což umožní další rozvoj biofilmu, který může dosáhnout nových dimenzí v důsledku environmentálních vlivů. (Singh et al. 2006) Odpoutávání není výsledkem jen fyzikálních vlastností reaktoru a biofilmového systému. Druh přítomných organismů je důležitý, ale možná ještě zásadnějším vlivem na odpoutání je proces jejich

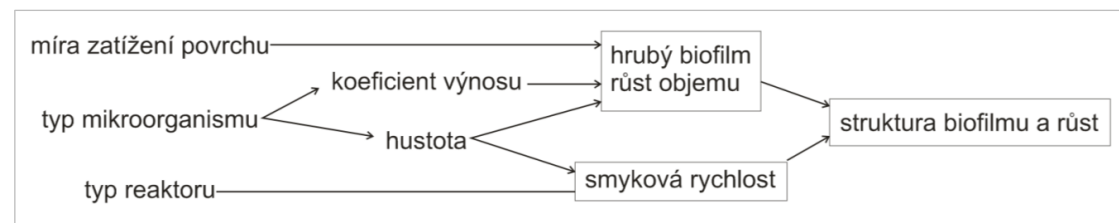
růstu. To podtrhuje nutnost přesného popisu struktury a vývoje biofilmu. (Loosdrecht et al. 1995; Tjihuis et al. 1994a; Lewandowski and Beyenal, 2007).

Tloušťka biofilmu a povrchová morfologie jsou výsledkem především podmínek v biofilmovém systému. Podle (Loosdrecht et al. 1995) má na tloušťku a povrchovou strukturu biofilmu hlavní vliv interakce resp. rovnováha mezi procesy růstu (vyplývající z rychlosti růstu na specifickém povrchu) a oddělováním (vyplývající především ze střižných sil). Obrázek 2 níže znázorňuje, jak tyto faktory souvisí s morfologií biofilmu (Loosdrecht et al. 1995; Lewandowski and Beyenal, 2007; Lewandowski 2007).



Obrázek 2 – Vliv vnějších podmínek na formaci biofilmu (Loosdrecht et al. 1995)

Vliv zatížení specifického povrchu substrátem a smykové síly nelze pozorovat samostatně, struktura biofilmu je ovlivněna poměrem mezi nimi. Procesy oddělování jsou ovlivňovány především faktory jako velikost smykových sil, rychlost růstu biofilmu, přítomnost výčnělků. Proces růstu je ovlivňován především faktory jako rychlost zatížení substrátem, výnos biomasy, hustota biomasy. (Loosdrecht et al. 1995; Brent and Peyton, 1996). Z těchto parametrů se mohou první dva v každém parametru měnit nezávisle na experimentu, třetí parametr (hustota biomasy a přítomnost výčnělku, resp. deformace) je ve skutečnosti výsledkem experimentálních podmínek. Z praktického hlediska; pouze první dva parametry mohou pomoci při sestavování konkrétních biofilmových systémů. Výnos biomasy a rychlost růstu silně závisí na druhu mikroorganismů přítomných v systému (rychleji rostoucí organismy tvoří biofilm tenčí a více porézní než pomaleji rostoucí). Mechanismus, jak mikroorganismy „cítí“ vyšší smykovou rychlost, a produkují silnější biofilm, není zatím znám. (Loosdrecht et al. 1995)



Obrázek 3 – Různé faktory ovlivňující strukturu biofilmu a jejich vztah (Loosdrecht et al. 1995)

1.6. Klasifikace biofilmových reaktorů

Biofilmový reaktor s nosiči biomasy má velký potenciál k rozvoji vysoce kvalitních procesů. V těchto reaktorech může být zachován velký obsah biomasy (až 30 g/l). Velký specifický povrch (až 3000 m²/m³) zajišťuje, že přeměny v biofilmu nejsou striktně omezeny difuzní rychlostí. Pro požadované parametry čistícího procesu jsou již stanoveny dané konstrukce biofilmových reaktorů a jejich optimální řízení. (Nicolella et al. 2000)

Biofilmové reaktory se používají v situacích, kdy je kapacita reaktorů s volně suspendovanými organismy omezena koncentrací biomasy anebo dobou zdržení. To může být případ buď pomalu rostoucích organismů (např. nitrifikujících či metanogenních mikroorganismů), jejichž růst v suspenzi vyžaduje dlouhou dobu; nebo pro velice ředěné proudy odpadních vod (kde může být zachována jen velmi nízká koncentrace biomasy). V těchto případech jsou biofilmy efektivním řešením pro úspěšné udržení biomasy v reaktorech, a pro zvýšení efektivity celého procesu. (Nicolella et al. 2000)

Charakteristickým rysem biofilmových reaktorů je kultivace biomasy ve formě bakteriálního nárůstu, biofilmu, resp. imobilizace bakterií na vhodném nosiči. Z tohoto hlediska je účelné rozdělit biofilmové reaktory podle typu nosiče a podle způsobu jeho kontaktu s odpadní vodou. Jen pro přehled jsou uvedeny následující technologie (Hlavínek 2010; Chudoba et al. 1991).

a) Zkrápěné biologické kolony (tzv. biofiltry)

Nosičem biofilmu je náplň kolony, která je zkrápěna odpadní vodou a v jejíchž mezerách proudí vzduch. Jako náplně byly v minulosti používány přírodní materiály (drcené kamenivo, vápenec, vysokopecní struska), později různé volně sypané plastové částice obdobného typu jako pro stripovací věže nebo jednoduše nasekané plastové trubice („husí krky“). Aerace je buď přirozená (komínovým efektem), nebo nucená.

b) Rotační biofilmové reaktory

- I. Rotační diskové reaktory – Nosičem biomasy jsou vhodně tvarované kotouče, které pomalu rotují v čištěné odpadní vodě. Při oxických procesech jsou disky ponořeny do vody jen částečně a dochází k střídavému kontaktu biofilmu s vodou a se vzduchem.
- II. Rotační klecové reaktory – Pracují na stejném principu jako rotační diskové reaktory, nosič biomasy je však upevněn v rotující konstrukci.

c) Ponořené biologické kolony

- I. S pevným ložem – Kolona je zcela zaplněna odpadní vodou, která zpravidla protéká zdola nahoru a do níž je ponořen nepohyblivý nosič biomasy. Tyto bioreaktory využívají nejrůznější profilované materiály jako tzv. biologické voštiny. Ve srovnání s volně sypanou náplní poskytují stále hodnoty rozhodujících parametrů (aktivní plocha, mezerovitost).

- II. S expandovaným a fluidizovaným ložem – Kolona je protékána zdola nahoru. Původní objem nosiče (obvykle volně sypané materiály) je u expandovaného lože zvětšen asi o 10 – 20 % oproti klidovému stavu. Fluidizované lože je charakterizováno vzájemným pohybem částic nosiče biofilmu vyvolaným proudem čištěné odpadní vody nebo vzduchem, přičemž expanze lože je obvykle okolo 100 % oproti klidovému stavu. Tyto systémy jsou označovány jako technologie MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor), detailnější popis následuje níže.

d) Reaktory s kombinovanou kultivací biomasy

- I. Systémy, kde je nosič biofilmu mimo aktivační nádrž.
- II. Systémy, kde nosič biofilmu je umístěn do aktivační nádrže. Biologické systémy fixující biomasu na pevných nosičích mají obvykle dvě základní konstrukční podoby reaktorů: s instalací pevně kotvených nosičů biomasy nebo s použitím nosičů biomasy ve formě tělísek vznášejících se v kapalině ve fluidním loži (typ MBBR technologie).

Systém MBBR

Systém MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor, pohybující se lože v biofilmovém reaktoru) má Evropský patent Sb. 0.575.314, USA patent Sb. 5.458.779. MBBR systém disponuje několika výhodami, jako jsou vyšší akceptovatelné objemové zatížení systému ve srovnání s klasickou aktivací, vysoká koncentrace biomasy, vysoká účinnost čištění, zvýšená odolnost vůči toxicitě a změnám v zatížení, nedochází k zanášení nosičů, pro růst biomasy se využívá celý objem nádrže, není zapotřebí recirkulace kalu. Jedná se o jednoduchý provoz a systém, který není citlivý vůči bytění kalu. (Brodelius a Vandamme, 1987)

Flexibilita technologie MBBR umožňuje navrhovat velice kompaktní a efektivní samostatné řešení a také provádět intenzifikace stávajících biologických procesů, často bez nároků na výstavbu nových nádrží. Systém přináší nižší investiční a provozní náklady a zapotřebí je menší zastavěné území (Kargi a Eyiisleyen, 1995), navíc umožňuje snadné oddělení suspendované a imobilizované biomasy v usazovací nádrži. V současnosti je v provozu více jak 400 velkých čistíren odpadních vod ve 22 různých zemích po celém světě. (Brodelius a Vandamme, 1987)

1.7. Nosiče biomasy

Cílem využití nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod, má za cíl podporovat bakteriální populace, které provádějí dekontaminaci. Nosič je pevným prvkem, který by měl nejen stabilizovat, ale především podpořit a vylepšit schopnosti mikroorganismů. Znalost potřeb bakteriální populace může dopomoci k pochopení procesů adheze a následně k tvorbě biofilmu. Výsledek může být přínosný při zdokonalování parametrů nosiče biomasy, resp. pro případ předkládané disertační práce i při jeho vývoji.

Bakterie přirozeně se vyskytující v přírodě mají tendence přirůstat k libovolnému povrchu, který se vyskytuje v jejich bezprostředním okolí. Například kamenivo v řekách, které dokonce sloužilo, jako

jeden z prvních reálných aplikací na čistírnách odpadních vod. Kamenivo nebylo příliš vhodné, především pro svou značnou hmotnost a nízký aktivní povrch. Proto se hledaly materiály, které tyto nevýhody kompenzují. Přešlo se na lehce dostupné a levné materiály jako plastové nasekané drenážní trubky, keramzit, perlit, písek, aktivní uhlí, sklo, aj. (Hermanowicz a Ganczarczyk, 1983; Mulcahy a Shieh, 1987). Tyto již splňovaly náročnější požadavky, ale často docházelo k zarůstání náplně, což vedlo k tvorbě anaerobních zón, a dále pak ke snížení aktivního povrchu a účinnosti.

Imobilizace mikroorganismů v přirozeném biofilmu je technologicky využívána již od počátku minulého století. Zkrápěné biofiltry používané pro čištění splaškových odpadních vod byly v minulosti masivně rozšířené i v ČR stejně jako tzv. anglické filtry využívané ve vodárenství pro pomalou filtraci surových vod. Biofiltry používané v čistírenství byly vesměs zkrápěné kolony, jejichž zásadní nevýhodou bylo zarůstání nosiče, limitace s dodávkou kyslíku a obecně nižší účinnost ve srovnání s klasickým aktivačním procesem (Chudoba et al., 1991). Zmíněné nevýhody většinou odstraňují kombinované systémy s biomasou jak fixovanou v ponořeném biofilmu, tak volnou (ve vznosu). První technologie využívaly fixované nosiče biomasy ve formě různých vestaveb, které byly tvořeny profilovanými plastovými konstrukcemi ve formě biologické voštiny. Tyto techniky neodstraňují s jistotou možnost zarůstání náplně a rovněž komplikují údržbu stavebních prvků bioreaktorů, zejména aeračních systémů. Z těchto důvodů jsou moderní nosiče biomasy tvořeny různými částicemi ve fluidním loži nebo jako vyjímatelné segmenty.

Nejnověji se jako nosiče biofilmu využívají obecně nejrozumnější podklady, speciálně připravené polymerní materiály s cílem maximalizace specifického povrchu nosiče a s vhodnou morfologií povrchu. Syntetické polymerní materiály jako polyakrylamid, polyuretan, polyetylén a polyvinylalkohol jsou úspěšně používány až v posledních letech (Tampion a Tampion, 1987; Powel, 1990; Trögl et al., 2012; Trögl et al., 2013). Nosiče zachovávají jednoduchost výroby, vysokou efektivitu a značnou možnost velikostní a tvarové variability.

1.7.1 Hlavní požadavky na nosič biomasy

Nosič biomasy je při čištění odpadních vod určujícím prvkem, který musí splňovat především následující vlastnosti:

- 1) Materiál musí být netoxický a kolonizovatelný.
- 2) Jelikož organismy jsou vysoce invazivní a povrch nosiče značně poškozují, musí být materiál biochemicky inertní, chemicky a fyzikálně stabilní.
- 3) Adheze buněk k povrchu je ovlivněna jeho hrubostí, chemickým složením a povrchovou úpravou. Na adhezi buněk má velký vliv hydrofobita/hydrofilita povrchu a jeho elektrostatický náboj (Pelletier a kol. 1997; Pospíšilová et al., 2010; Palmer et al., 2007).
- 4) Materiál musí být morfologicky vhodný. Vliv povrchové struktury na stabilitu biofilmu byla předmětem různých studií (Mulder and Heijnen 1988; Heijnen et al. 1992). Tyto studie ukazují, že drsnost povrchu nosiče zlepšuje rozvoj biofilmu. Další studie poukázaly také na skutečnost, že drsnost povrchu je dominantním faktorem pro růst biofilmu, a to více než fyzikálně-chemické vlastnosti daného povrchu (Loosdrecht et al. 1988). Význam drsnosti povrchu lze vysvětlit tím, že adherující buňky musí být chráněny před uvolněním díky

smykovému tření s cílem udržet se dostatečně dlouho na povrchu pro nezvratnou adhezi, aby mohlo dojít k tvorbě mikrokolonií a nakonec i k rozvoji biofilmu. Význam drsnosti povrchu nosiče je ovlivněn také specifickými podmínkami reaktoru; pro více drsné nosiče neexistuje žádný teplotní vliv, zatímco pro hladké nosiče dochází k tvorbě biofilmu pouze při vyšších teplotách. Při nízkých teplotách dochází k pomalejšímu růstu, což vede k relativně silnějšímu účinku střížných sil na biofilm. (Loosdrecht et al. 1995; Brent and Peyton, 1996) Bakterie kolonizují raději hrubé povrchy, protože zde působí menší smykové síly a samotný povrch substrátu přepočítaný na jednotku plochy je větší (Donlan 2002).
















- 5) Je vhodné použít jedinečný design nosiče s cílem maximalizovat aktivní povrch (maximalizovat plochy pro aktivní biofilm). Mikroorganismy raději narůstají na vnitřní struktuře nosičů nebo uvnitř porézní struktury, jelikož zde jsou více chráněné, především před střížnými silami při aerobním míchání.
- 6) Měrná hmotnost musí být srovnatelná s vodou (resp. s odpadní vodou). I po nárůstu biomasy případně sraženin musí být komplex densitně srovnatelný s odpadní vodou. Tato vlastnost je zásadní pro minimalizaci nákladů na míchání.
- 7) Zásadní je optimální velikost nosiče vzhledem k technickému řešení odtokových armatur a složení odpadní vody (možný obsah nerozpuštěných látek, či vznik sraženin).
- 8) Důležitý je výběr aplikace nosiče. Nevýhody pevně instalovaných nosičů odstraňují systémy s nosičem biomasy ve fluidním loži, kde je možné regulovat intenzitou aerace střížné síly na povrchu nosiče a do značné míry tak v případě potřeby regulovat mocnost biofilmu a omezit tvorbu inkrustů (Odegaard et al., 1999). Tyto nosiče jsou čerpatelné, čímž umožňují násobně jednodušší obsluhu aeračního systému. Zásadní výhodou je rovněž široké spektrum plnění reaktoru nosičem (zpravidla 25 – 70 %) a z toho plynoucí možnost intenzifikace (Odegaard 2006).
- 9) Nezanedbatelnou roli hraje cenová přijatelnost nosiče, nízké náklady při zachování jednoduchosti výroby.

1.7.2 Přehled nosičů biomasy

V dnešní době vyrábí nosiče biomasy mnoho firem, avšak většina z nosičů si jsou navzájem velice podobné. Obecným vzorem je vždy variace materiálu HDPE (vysokodensitní polyetylen) o hustotě mírně nižší než 1000 kg/m^3 . Tvar se příliš neliší, vždy jde o cylindrickou buňku či hranol, kde většina specifického povrchu se nachází na vnitřní straně nosiče. Porovnání parametrů aktuálně dostupných polyethylenových nosičů včetně výrobců a fotodokumentace je uveden na následující straně. (McQuarrie et al., 2011)

Přestože jsou nosiče vyrobené z polyetyleny vysoce spolehlivé, vědecké týmy po celém světě hledají další alternativy nosičů (například vysoce porézní keramické nosiče, Dong et al., 2011)

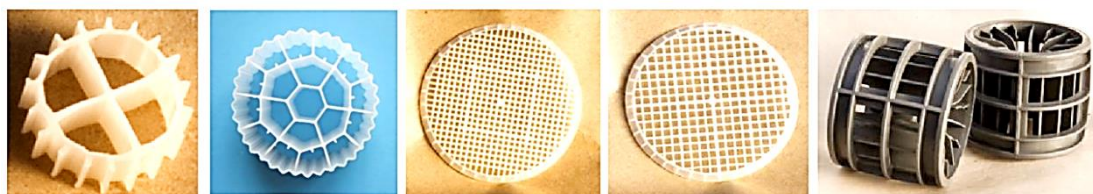
Tabulka 1 – Přehled komerčně dostupných polymerních nosičů biomasy a jejich parametrů (McQuarrie et al., 2011)

Výrobce	Název nosiče	Specifický povrch	Rozměry (výška; průměr)	Fotografie nosiče
Veolia Inc.	AnoxKaldnes™ K1	500 m ² /m ³	7 mm; 10 mm	
	AnoxKaldnes™ K3	500 m ² /m ³	12 mm; 25 mm	
	AnoxKaldnes™ Biofilm Chip M	1200 m ² /m ³	2 mm; 48 mm	
	AnoxKaldnes™ Biofilm Chip P	900 m ² /m ³	3 mm; 45 mm	
	AnoxKaldnes™ F3	200 m ² /m ³	nezjištěno	
Headworks BIO (licence: Infilco Degremont, Inc.)	ActiveCell™ 450	402 m ² /m ³	15 mm; 22 mm	
	ActiveCell™ 515	485 m ² /m ³	15 mm; 22 mm	
	ActiveCell™ 920	680 m ² /m ³	15 x 15 x 10 mm (v x š x h)	
Aq Wise	ABC4™	600 m ² /m ³	14 mm; 14 mm	
Entex Technologies, Inc.	Bioportz™	589 m ² /m ³	14 mm; 18 mm	
Siemens Water Technologies Corp.	CM-10D™	750 m ² /m ³	9 mm; 13 mm	
Biowater Technology	BWT15™	828 m ² /m ³	15 x 15 x 5 mm (v x š x h)	
	BWTX™	640 m ² /m ³	15 x 15 x 10 mm (v x š x h)	
CLV Inc.	EWT™ FlooBed® RF438	190 m ² /m ³	36 mm; 44 mm	
	EWT™ FlooBed® RF127	nezjištěno	nezjištěno	

1.7.3 Nosiče biomasy AnoxKaldnes (Veolia Inc.)

Příkladem novodobých fluidních nosičů je celá řada komerčních nosičů AnoxKaldnes™ v uspořádání MBBR (Moving Bed Biofilm Reactor). Jádrem technologie jsou suspendované nosiče biomasy, které jsou speciálně navrženy tak, aby chránily aktivní plochu biofilmu a poskytovaly optimální podmínky pro bakterie. Nevýhodou technologie je nutnost změny aeračního systému ČOV, což často vyžaduje nutné dodatečné finanční investice.

Společnost Veolia Inc. (původně AnoxKaldnes) vyvinula několik typů nosičů s různým tvarem, průměrem a velikostí aktivního povrchu v závislosti na dané aplikaci. V současné době jich firma dodává na trh pět – K1, K3, BiofilmChip™ M, BiofilmChip™ P a F3 (viz *obrázek 4*). Tato různorodost poskytuje flexibilitu při výběru nejvhodnějšího nosiče v závislosti na vlastnostech odpadních vody, předčištění, odtoku, dostupných objemech reaktoru a také v závislosti na charakteru mikrobiální populace (pro nitrifikace se užívají jiné nosiče než pro běžné ČOV). Uvedené nosiče jsou převážně používány pro odstraňování BSK, denitrifikaci a nitrifikaci, vlastnosti nosičů jsou uvedeny výše v *tabulce 1*.



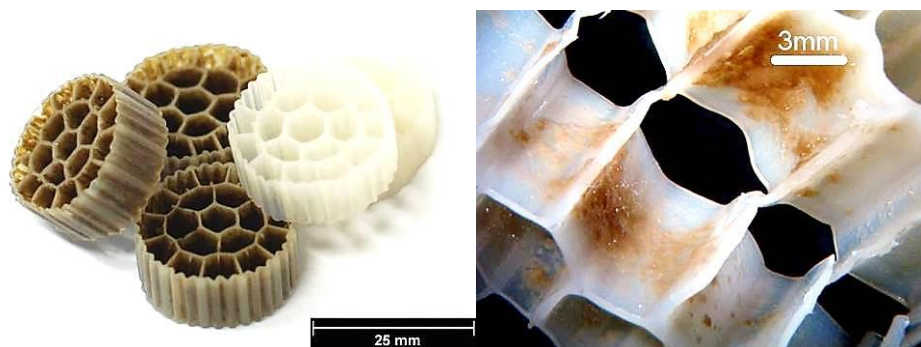
Obrázek 4 – Nosiče AnoxKaldnes, zleva K1, K3, BiofilmChip™ M, BiofilmChip™ P a F3 (Le Noir, 2011; AnoxKaldnes™ MBBR)

Nosič AnoxKaldnes typ K3

V předkládané disertační práci je vyvíjený nanovláknový nosič porovnáván s nosičem typu K3. Parametry nosiče K3 jsou následující.

Cylindrický tvar nosiče typu K3 má rozměry 25 mm v průměru a 12 mm na výšku. Z vnější strany má malé výběžky připomínající lopatky vodního kola. Uvnitř je nosič rozdělen žebrováním. Biofilm se ideálně vyvíjí v prostoru uvnitř nosiče, neboť je zde chráněn proti střízným silám vody a vzduchu. Celkový užitý povrch je $600 \text{ m}^2/\text{m}^3$, z čehož chráněný vnitřní povrch činí $500 \text{ m}^2/\text{m}^3$. Nosič je vyroben z vysoko-densitního polyetyleny (HDPE), jehož hustota je udávána v rozmezí $940 - 980 \text{ kg}/\text{m}^3$, což zajišťuje, že i po nárůstu biomasy se hustota celého komplexu pohybuje na úrovni odpadní vody a pro jejich udržování ve vznosu je zapotřebí dodávat minimum energie. (Odegaard 2006; McQuarrie et al., 2011; Le Noir, 2011; AnoxKaldnes™ MBBR)

Polyetylenové nosiče mohou tvořit až 70 % objemu nádrže reaktoru a jsou navrhovány tak, aby suspendovány ve vodě poskytovaly co největší chráněný povrch pro nárůst biofilmu a optimální podmínky pro rozvoj bakteriálních kultur. (AnoxKaldnes™ MBBR).



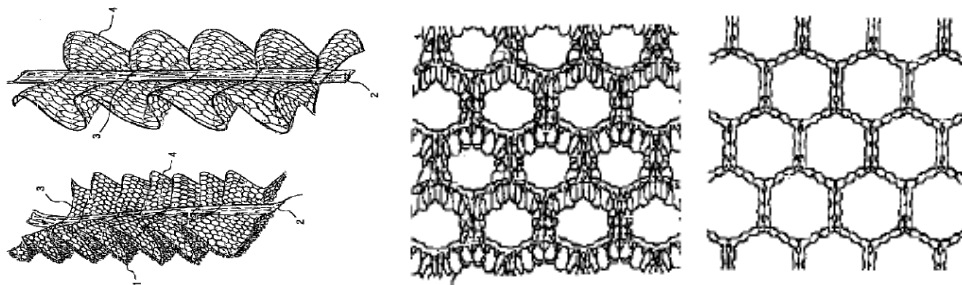
Obrázek 5 – Komerční nosič AnoxKaldnes™ MBBR (nový a použitý nosič, detail kolonizace nosiče K3)

1.7.4 Textilní nosiče biomasy

Z patentové rešerše na celosvětový stav techniky textilních nosičů biomasy pro čištění odpadních vod, se zaměřením na pleteninové textilie plošného typu (případně i chomáčového typu) byly vybrány následující příklady, které poskytují základní přehled o dostupných vzorech. Další nosiče byly jen modifikací zde uvedených. (Komberec, 2011)

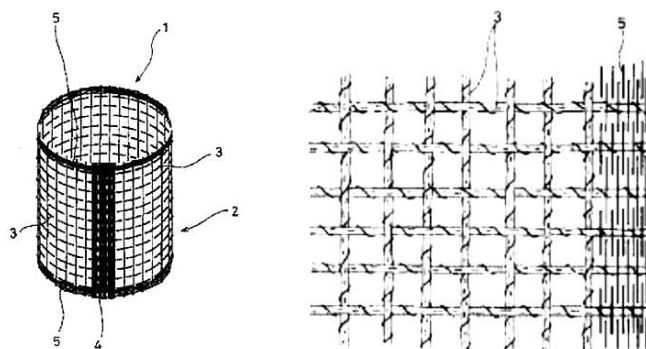
a) Nosiče biomasy – pleteniny

1. Nosič je tvořen pleteninou za účelem dosažení zvýšené trvanlivosti, zvětšení povrchu nosiče a zlepšení účinnosti čištění odpadních vod. Nosič se skládá ze dvou částí. Jednak jsou to syntetická vlákna ve smýčkovém pletení, aplikují se pro zvýšení povrchu a zlepšení přilnavosti mikroorganismů. A dále je to plisé (skládaná síťovina), aplikována z důvodu zvýšení tuhosti nosiče, zabránění chvění a vzájemného kontaktu kvůli vodním proudům, dále pro zvýšení styčné plochy a zrychlení čistícího procesu. (Komberec, 2011)



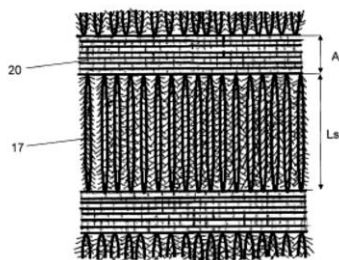
Obrázek 6 – Pleteninový nosič biomasy, smýčkový (Komberec, 2011)

2. Válcový fluidní nosič biomasy je tvořen sítí pletených vláken. Vlákná použitá v pletenině mají pevnější charakter (pro udržení tvaru). Prahová pásma mají vyšší koncentraci vláken, která jsou navíc tepelně opracována. Použit byl polypropylen, polyester (vlákna mohou být alternativně bavlněná). (Komberec, 2011)



Obrázek 7 – Pleteninový nosič biomasy, válcový (Komberec, 2011)

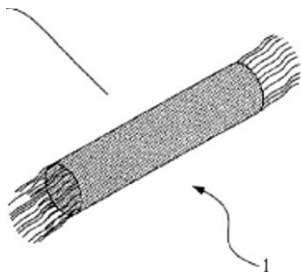
3. Inertní polymerní nosič pletený nebo tkaný, charakteristický hustými shluky výčnělků a smyček, které poskytují dostatečně velkou plochu pro mikroorganismy. Textilie je zpracována z polyamidových vláken tvořící chomáče. Tkaná textilie obsahuje osnovní a útková chomáčová vlákna z polyamidu. Používaná příze má hustotu 35 dtex v osnovní i útkové části. Hustota chomáčů na osnovním vlákně je 40 – 80 ks/dm, na útku 50 – 60 ks/dm. Poměr útkové šíře pásu <A> k osnovním vláknům <Ls> je jedna ku třem až jedna ku osmi. (Komberec, 2011)



Obrázek 8 – Pleteninový nosič biomasy, plochý (Komberec, 2011)

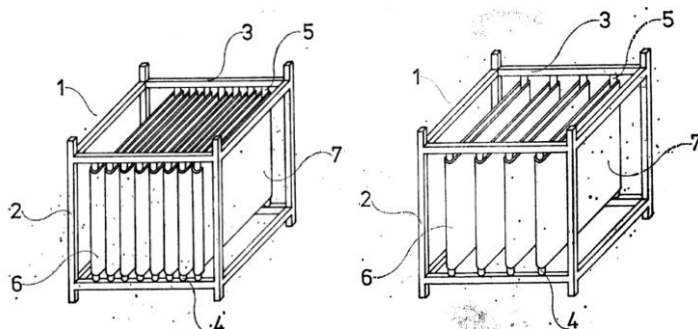
b) Nosiče biomasy – tkaniny a netkané textilie

1. Nosič mikroorganismů ve tvaru síťované trubice s roztřepenými konci je vytvořen z netkané textilie o délce cca 5 cm. Netkaná textilie ideálně obsahuje vlákna typu polypropylen, polyetylen, polyvinylalkohol, akryl, vlákna mají tloušťku kolem 0.1 mm. Velikost pór v síťované trubici je při tloušťce 3 mm – 0.26 × 0.25 mm; při tloušťce 5 mm – 0.75 × 0.85 mm; při tloušťce 10 mm – 1 × 1.4 mm; při tloušťce 15 mm – 1.5 × 1.8 mm; při tloušťce 20 mm – 1.8 × 1.9 mm. (Komberec, 2011)



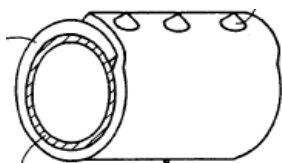
Obrázek 9 – Nosič biomasy z netkané textilie, válcový (Komberec, 2011)

2. Ponorný nosič biomasy k biologickému čištění odpadních vod obsahuje textilní pás, kde stěny textilního pásu jsou uspořádány paralelně a jsou tvořeny z tkaniny pro filtrační plachetky pásových lisů, tkaniny pro vzduchové filtry, případně jiné tkané i netkané textilie. (Komberec, 2011)



Obrázek 10 – Nosič biomasy tkaninový, pásový (Komberec, 2011)

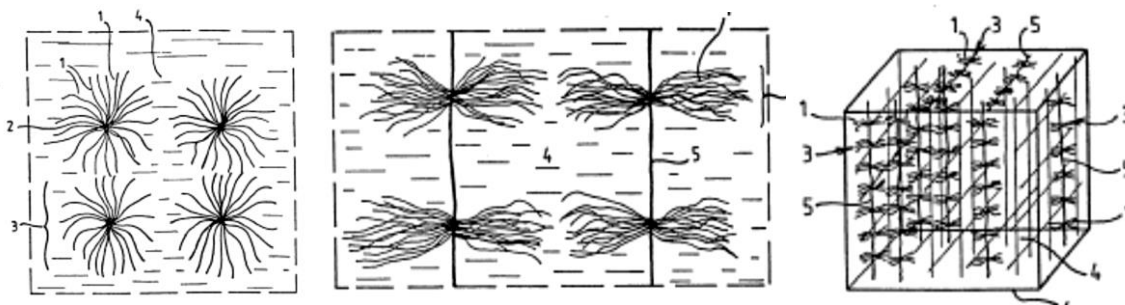
3. Nosič využívá kombinace plastového nosiče (válcové plastové trubky, vinylchloridová pryskyřice) a netkané textilie, která je skutečným nosičem biomasy, kde se tvoří biofilm. V patentu je popsáno několik řešení, jak spojit obě dvě složky v jeden nosič, bez užití lepení a podobně. Textilie se do trubky buď vkládá, nebo je trubka opatřena výstupky pro aretaci. (Komberec, 2011)



Obrázek 11 – Nosič biomasy kombinovaný z plastu a netkané textilie, válcový (Komberec, 2011)

c) Nosiče biomasy – nespecifikované textilie a ostatní

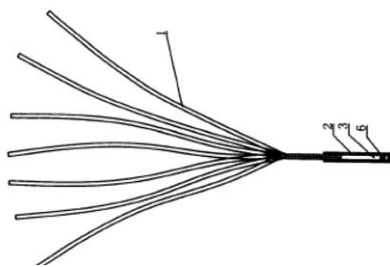
1. Nosný materiál pro biomasu má podobu bambulí. Bambule může být tvořena dráty, pásky nebo vlákny. V případě vláken se jedná o PVA vlákna, kde každá babule má až 81 000 pramenů vláken o tloušťce 70 μm . (Komberec, 2011)



Obrázek 12 – Nosič biomasy textilní, bambule (Komberec, 2011)

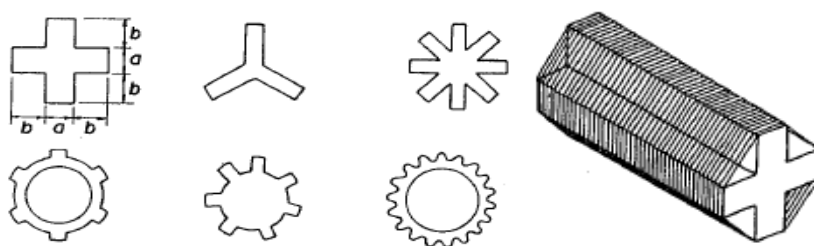
2. Nosič k čištění vody tvoří „umělou trávu“. Upevňovací okraj drží jednotlivé proužky umělé trávy. Proužky umělé trávy slouží jako nosiče mikroorganismů. Povrch umělé trávy je tvořen makromolekulární sítí z polyuretanových a nylonových vláken. Pórovitost makro-molekulárního

materiálu může dosahovat až 80 %, specifický povrch představuje i více než $1000 \text{ m}^2/\text{m}^3$. (Komberec, 2011)



Obrázek 13 – Nosič biomasy textilní, umělá tráva (Komberec, 2011)

3. Plastová částice různých tvarů má na vnější straně zářezy a kolem nich jsou navíjeny vlákna nebo příze. Může se jednat o přírodní i umělá vlákna typu polyetylen, polystyren, polyuretan. Jedná se o nízkonákladové řešení nosné částice pro biomasu. (Komberec, 2011)



Obrázek 14 – Nosič biomasy kombinovaný z plastu a textilie, válcový (Komberec, 2011)

2 OBRAZOVÁ ANALÝZA BIOFILMOVÝCH STRUKTUR

Pokrokovým prostředkem hodnocení materiálových struktur je využití analýzy obrazu. Obrazová analýza poskytuje v jistých směrech dokonce mnohem více zajímavých výsledků než doposavad standardně užívané metody. Velkou předností analýzy obrazu může být její rychlost, objektivní hodnocení, efektivita při zpracování velkého množství dat, také nevyžaduje žádnou větší zkušenost s analytickým postupem. V biologické praxi je pak výhodou neinvazivní charakter hodnocení. (Hlaváč, Šonka 1992; O'Gorman et al. 2008; Wu et al. 2008)

Obecně lze měřicí metody rozdělit podle toho, zda v průběhu měření dochází ke změně původní struktury, nebo vlastností měřeného objektu; jinak řečeno, zda lze stejné měření provést na totožném vzorku opakovaně. Existují metody invazivní, které původní strukturu poškozuji (metody rozpouštění, zahřívání nebo metody mechanického poškození objektu), a metody neinvazivní, které využívají především různých druhů záření, různé druhy spektroskopie, difrakční a optické metody.

Zde uváděná metoda umožňuje neinvazivním způsobem hodnocení bakteriálního biofilmu na nosičích biomasy za využití optické mikroskopie (bez využití barviv, fixace vzorku aj.), kde obraz je finálně digitálně zpracován (Pirkl, 2003). Cílem disertační práce je charakterizovat bakteriální biofilm neinvazivní metodou (umožňuje opětovné použití měřeného vzorku) tak, aby výsledky měly stejnou vypovídací schopnost s výstupy, které lze získat standardními invazivními metodami (jako například stanovení sušiny). Výsledkem předkládané disertační práce je potvrzení možnosti použití metody analýzy obrazu k charakterizaci bakteriální populace a k určení kinetiky růstu biofilmu. Teoretické podklady k této problematice následují v této kapitole.

Analýza obrazu (image analysis) je proces získávání smysluplných informací z obrazu pomocí technik zpracování obrazu (image processing techniques). Které informace jsou důležité, je závislé na konkrétním úkolu nebo situaci. Mohou to být jednoduše barvy, velikost nebo tvar zkoumaných objektů nebo to mohou být i složitější parametry, jako determinace textury.

Zpracování obrazu poskytuje širokou sadu nástrojů a metod, které jsou aplikovány na vstupní data (obraz) obvykle dle chronologických postupů. Postupy lze rozčlenit do následujících kategorií, pořízení obrazu, před-zpracování obrazu, vylepšení obrazu, segmentace obrazu, morfologické zpracování obrazu a identifikace oblastí.

2.1. Pořízení obrazu

Je nutné si uvědomit, že pořízení (zachycení) obrazu odpovídá transformaci skutečné scény z 3D prostoru do virtuální scény 2D prostoru. Digitální obraz je aproximací skutečné scény, díky tomu je velice zanedbán prostorový efekt. Jak bude sepsáno dále, v předkládané disertační práci je možné tuto chybu transformace zanedbat.

Při pořizování obrazu velice záleží na všech prvcích systému, například jsou to snímáný objekt a jeho vlastnosti (odrazivost, průhlednost aj.), sledovaná scéna (měnící se pozadí, šumy a defekty), zdroje světla ozařování předmětu (denní světlo je časově i barevně nestálé) a jeho charakteristika (bodové, plošné, difuzní světlo, temné pole), využití optických čoček a filtrů (polarizační filtry), snímací zařízení

(mikroskopický objektiv a jeho charakteristiky, jako ohnisková vzdálenost, světelnost, zaostření), snímací zařízení (kamera nebo fotoaparát, typ CCD čipu, citlivost, šum, rozlišení) a mnoho dalšího (Hlaváč, Šonka 1992). Rozličnost parametrů, které je nutné v rámci pořízení obrazu prostudovat, aby byl výsledný obraz ideálním snímkem reálného objektu, je velice mnoho. V důsledku omezeného rozsahu disertační práce nejsou tyto popsány dále.

Obecně je nemožné zachytit všechny chyby systému a dokázat je eliminovat nebo dokonce odstranit. Finálně lze konstatovat, že je nemožné získat ideální obraz. Avšak vhodným seřízením celého systému pro snímání scény je možné předcházet dalšímu zdlouhavému či náročnému zpracování obrazu.

2.2. Korekce obrazu

Původní mikroskopický snímek je nutné nejprve předzpracovat (zostření, úprava jasu, kontrastu). Dále je možné nastavit přídavné filtry, například pro odstranění nežádoucích složek obrazu (prach, škrábance, vzduchové bubliny aj.). Obraz se následně převede do příslušného barevného modelu podle toho, jaký parametr se bude určovat (CIELAB barevný prostor, šedotónový či binární obraz).

V obrazové analýze je dále nutné obraz rozčlenit na místa zájmu (bakteriální biofilm) a ostatní (pozadí a případně residuální nečistoty). Výsledkem jsou specifické obrazy, kde existují jednoznačně barevně odlišené jednotlivé části (pozadí, nosič, biofilm). Principem analýzy je rozpoznat pro člověka zřejmé vizuální rozdíly barevného zastoupení a detekovat biofilm. V detekovaném biofilmu je dále cílem charakterizovat parametry struktury, kinetiku růstu a další.

2.2.1. Před-zpracování obrazu

Před analýzou dat, se provádí prvotní zpracování (pre-processing), a to obvykle z důvodu nápravy poškozeného obrazu (například z důvodu fyzikálních vlastností systému). Jedním z častých problémů je světelná nehomogenita, která může významně ovlivnit výslednou kvalitu obrazu. Další může být například vinětace, která snižuje obrazový jas nebo sytost na okrajích snímku, často je způsobena chybným nastavením fotoaparátu či objektivu.

2.2.2 Vylepšení obrazu

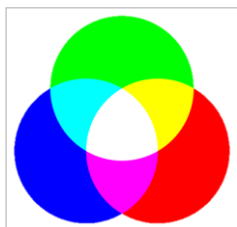
Vylepšení obrazu je procesem zvyšování kvality obrazu (kontrast, jas, úprava rozlišení, detekce hran) pro usnadnění následné analýzy (Wu et al. 2008). Metody pro zlepšení obrazu byly již vyvinuty a ověřeny (například metoda kontrast strečink, jednoduchá metoda, která může zvýšit kontrast obrazu a odstranit šum Mediánovým filtrováním). Jiné metody zahrnují např. vyrovnávání histogramu, průměrování, ostření důležitých částí obrazu jako jsou hrany nebo obrys (Wu et al. 2008; Matlab 2013).

2.2.3. Barevné prostory obrazu

Barevné prostory lze rozčlenit na prostory závislé na vlastnostech zařízení, jako je například RGB a prostory nezávislé na zařízení, například CIELAB. Souřadnice prostoru závislého na zařízení (RGB) podávají informaci, jak danou barvu složit (výčíslené hodnoty jednotlivých barevných složek), avšak neříkají nic o vizuální podobě dat reprodukováných na odlišných zařízeních. Naopak souřadnice v nezávislém barevném prostoru (CIELAB) definují vizuální podání barev bez znalosti vyjádření hodnot dílčích barevných složek. (Pospíšilová a Roušarová, 2010)

1) RGB barevný prostor

V systému RGB se jedná o aditivní míšení barev, což lze demonstrovat promítnutím světelných kuželů základních barev na bílou podložku tak, aby se tyto kužely vzájemně protínaly. Barvy žlutá (Y), purpurová (M) a azurová (C) se též nazývají barvy doplňkové. Aditivním míšením RGB světla, ale též CMY světla, vznikne světlo bílé. Při úplné absenci RGB světla vznikne černá barva. (Pospíšilová a Roušarová, 2010)



Obrázek 15 – Barevná reprezentace modelu RGB (Pospíšilová a Roušarová, 2010)

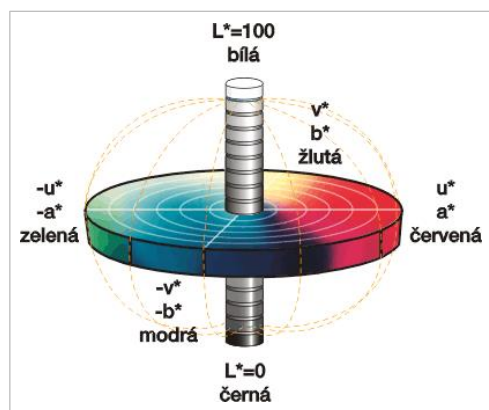
Na principu aditivního míšení světla pracuje např. barevná televize, barevné obrazovky počítačů, projektorů a používá se pro kódování barev na webové stránky. RGB model sám o sobě nedefinuje, co je míněno červenou, modrou a zelenou kolorimetricky, výsledek smíchání složek není přesný, ale relativní. Když bude přesně definována chromatičnost barevných složek, potom se barevný model stává absolutním barevným prostorem nezávislým na zařízení, jako sRGB. (Pospíšilová a Roušarová, 2010)

2) CIE L*a*b* barevný prostor

Barevný model CIELAB (Commission Internationale de l'Eclairage LAB, kde L je měrná světlost, složky a^* , b^* jsou chromatické osy) je založen na lidském vnímání barev tak, aby obsáhl množinu všech barev, které lze zachytit lidským okem. Důležitý aspekt barevné soustavy CIELAB vychází z jeho nezávislosti na zařízení, díky čemuž je víceméně objektivní. Uvedená barevná soustava vychází z předpokladu, ve kterém stejně subjektivně vnímané vjemy barvy odpovídají stejné vzdálenosti a naopak. V prostoru CIELAB jsou rozdíly mezi body vykresleny tak, aby korespondovaly s vizuálními rozdíly mezi vykreslenými barvami. (Pospíšilová a Roušarová, 2010)

Na obrázku 16 je definována osa L jako definující měrnou světlost, která pokrývá rozsah hodnot v intervalu 0 (černá) až 1 (bílá). Souřadnice chromatických os a^* , b^* nejsou nijak numericky limitovány, avšak reprezentují rozsahy od zelené (záporná část osy a^*) po červenou (kladná část osy a^*) a od modré (záporná část osy b^*) po žlutou barvu (kladná část osy b^*), Špička a Fischer, 2002;

Pospíšilová a Roušarová, 2010). CIELAB barevný prostor umožňuje určit vizuální rozdíly v obraze a kvantitativně je vyjádřit. Lze měřit rozdíl mezi dvěma barvami použitím jednoduché Euklidovské vzdálenostní metriky. Pomocí funkce shlukování (clusterizace) se oddělí jednotlivé barevné skupiny. Tohoto postupu lze využít jak pro přípravu snímků při hodnocení biofilmu, tak dále například pro hodnocení Gram-pozitivity/negativity aktivovaného kalu aj. (Chitade 2010; Moore 2001; Pelleg and Moore, 2000).



Obrázek 16 – Reprezentace modelu CIELAB (Pospíšilová a Roušarová, 2010)

3) HSV barevný prostor

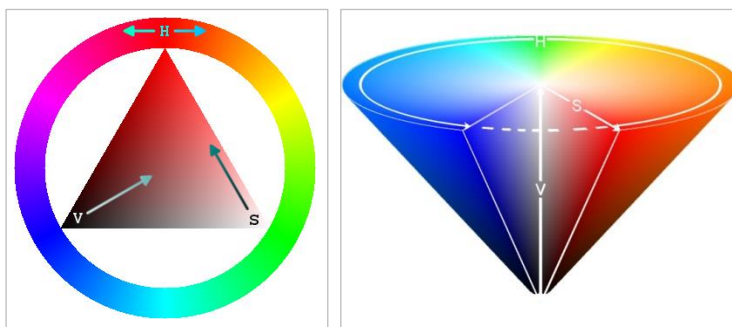
HSV (Hue, Saturation, Value), známý též jako HSB (Hue, Saturation, Brightness), je barevný model, který byl vytvořen již v roce 1978. HSV barevný model nejvíce odpovídá lidskému vnímání barev. Cílem HSV je přesnější popis vnímání barevných vztahů, oproti RGB. HSV je tvořen kombinací tří složek:

Hue je barevný tón nebo odstín, jedná se o barvu odraženou nebo procházející objektem. Měří se jako poloha na standardním barevném kole (0° až 360°). Obecně se odstín označuje názvem barvy.

Saturation neboli sytost barvy, příměs jiné barvy. Někdy též chroma, síla nebo čistota barvy, představuje množství šedi v poměru k odstínu, měří se v procentech od 0 % (šedá) do 100 % (plně sytá barva). Na barevném kole vzrůstá sytost od středu k okrajům. (např. červená s 50% sytostí je růžová).

Value je hodnota jasu neboli množství bílého světla. Jedná se o relativní světlost nebo tmavost barvy. Jas obecně vyjadřuje, kolik světla barva odráží. Resp. odpovídá přidávání černé do základní barvy. (web HSV barevný prostor, 2013)

Model HSV je obvykle používán v grafických aplikacích, když je potřeba změnit barvu způsobující specifický grafický element. K tomu se používá HSV kruh (resp. trojúhelník). Vzhled je prezentován oběžnou oblastí a separovanou trojhrannou oblastí. Typicky vertikální osy trojúhelníku ukazují nasycení, zatímco horizontální osy korespondují hodnoty. Takto může být barva vybrána prvním výběrem z kruhové oblasti a poté výběrem požadovaného nasycení a hodnoty z trojúhelníkové oblasti. Kuželová (konická) reprezentace HSV modelu je vhodná k zobrazení celého HSV barevného prostoru v jediném objektu. V této prezentaci je odstín líčen jako trojrozměrné konické tvoření barevného kola. Saturace je reprezentována vzdáleností od centra kruhového průřezu kuželem a hodnota je vzdálenost od špičatého konce kužele. (HSV barevný prostor, 2013)



Obrázek 17 – Trojúhelníková a kuželová reprezentace HSV modelu (HSV barevný prostor, 2013)

4) Šedotónový a černo-bílý barevný prostor

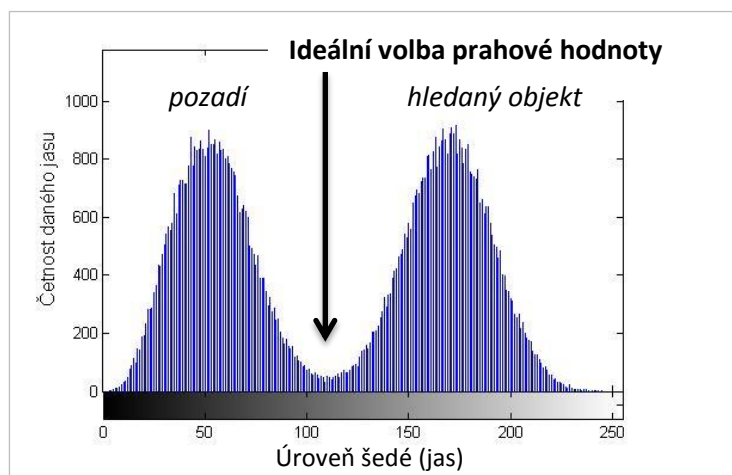
Po selekci požadovaných dat v CIELAB nebo HSV prostoru se obraz převede do šedo-tónového obrazu, kde lze získat výsledky typu texturních parametrů (energie, entropie, fraktální dimenze). Z šedo-tónového obrazu, který má 256 úrovní šedé, se pomocí prahování (metoda Otsu) určí hranice objekt-pozadí (resp. buňky-pozadí), a provede se převod na binární obraz, který má již jen 2 úrovně šedé, resp. jen bílá (1) a černá (0). Prahování je postup, ve kterém jsou všechny pixely s hodnotou škály šedé pod určitou hodnotou (prahem) změněny na 0 a všechny nad prahem změněny na 1. Tímto způsobem získáme černobílý snímek, který se skládá ze dvou rozeznatelných částí (Lewandowski 2007; Lewandowski and Beyenal, 2007; Yang et al., 2000). Z binárního obrazu se určují plošné parametry (počet objektů, osídlená plocha, průměrná difuzivita, kulatost, směrovost objektů a další). Obecně jsou jednotkami parametrů pixely, případně po přepočtu díky měřítku mikro-metry.

2.3. Segmentace obrazu

Segmentace je základním úkonem při zpracování obrazu, je velmi důležitá pro následnou analýzu obrazu. Jedná se o proces, který rozděljuje obraz do disjunktních oblastí, obvykle odpovídajících určitým objektům (například na pozadí zkoumané oblasti a hledané objekty). Jakmile jsou určité objekty izolovány, mohou být měřeny, klasifikovány a analyzovány. (Wu et al. 2008) Prahování je základní technikou identifikace oblastí, která je užitečná zejména pro homogenní objekty umístěné na jednotném kontrastním pozadí. Pro detekci prahové hodnoty byla použita metoda Otsu. Otsu metoda určuje tzv. práh (hodnotu rozdělení obrazu), aby se minimalizoval rozptyl mezi oběma segmenty (mezi černými a bílými pixely), (Wu et al. 2008; Otsu, 1979; Matlab 2013).

$$\text{Přepis segmentace je platný dle rovnice} \quad f_c = \begin{cases} A & \text{pokud } c < \text{práh} \\ B & \text{pokud } c \geq \text{práh} \end{cases} \quad (1)$$

Kde c je vstupní hodnota jasu; $f(c)$ je výsledná hodnota pixelu; práh je prahovací hodnota (pro šedotónový obraz v rozmezí 0 až 255, všechny hodnoty jasu nižší než práh odpovídají pozadí, všechny hodnoty vyšší než práh odpovídají detekovaným objektům); A a B jsou nové hodnoty pixelu (pro výsledný binární obraz 0 nebo 1), (Wu et al. 2008; Otsu, 1979).



Obrázek 18 – Příklad histogramu obrazu a volby ideální prahové hodnoty

2.4. Morfologické zpracování obrazu

Morfologické zpracování je širokým souborem operací zpracování obrazu, které jsou založeny na aplikaci strukturního prvku (resp. elementu, předdefinovaného tvaru) na objekt ve vstupním obrazu. Hlavní myšlenkou je zkoumat obraz se strukturním elementem a kvantifikovat, jakým způsobem se element hodí nebo nehodí do obrazu. Hodnota každého pixelu ve výstupním obraze je založena na srovnání odpovídajícího pixelu ve vstupním obraze se svými sousedy. Sousedství pixelu je určeno tvarem a velikostí strukturního prvku. Úpravou těchto dvou parametrů, je možné sestavit morfologickou operaci, která je citlivá na konkrétní tvary ve vstupním obraze. Základní morfologické operace jsou eroze a dilatace (eroze jednoduše zmenšuje obrazové objekty, odstraňuje pixely na hranicích objektu; dilatace rozšiřuje obrazové objekty, přidává obrazové body na hranice objektu). (Wu et al. 2008; Matlab 2013)

2.5. Identifikace oblastí

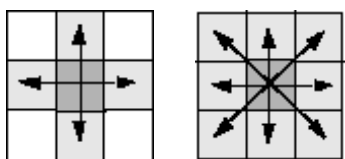
Identifikace oblastí je proces, který umožňuje identifikaci jednotlivých regionů (objektů či oblastí) v obraze. Metoda identifikace oblastí je nezbytná pro popis regionu, což může být provedeno například metodou komponentního označování (metoda component labelling), která transformuje binární obraz na symbolický s cílem identifikovat každou připojenou komponentu v obraze. (Wu et al. 2008; Shapiro, 1996), nebo lze využít shlukovacího algoritmu K-Means (Chitade, 2010; Pelleg and Moore, 2000).

2.5.1. Metoda component labelling

Metoda „connected components labeling“ skenuje obraz a sjednocuje objekty v něm do skupin pixelů na základě konektivity pixelů (4 nebo 8 konektivity), tj. všechny body konektivity sdílejí

podobné hodnoty intenzity obrazových bodů a jsou nějakým způsobem spojeny. Připojení (konektivita) determinuje, které pixely jsou napojeny k jiným pixelům. Určení, které pixely utváří spojení (konektivitu) závisí na tom, jak je spojení definováno. (Matlab 2013)

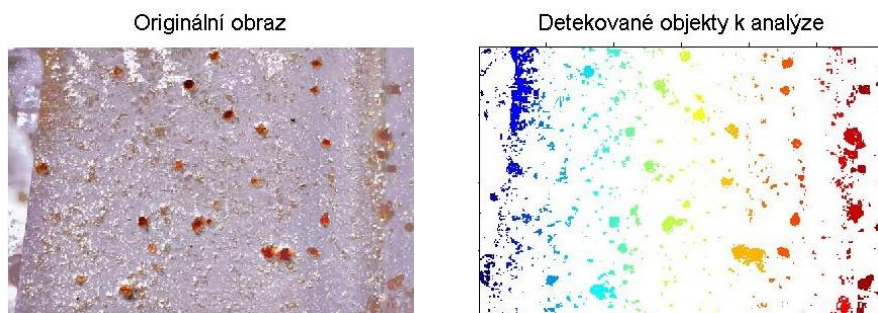
V obraze je užívána dvojrozměrná konektivita, a to 4-připojení nebo 8-připojení (4-connected nebo 8-connected). Pro 4-připojení platí, že pixely jsou spojeny, jen pokud se dotýkají jejich hrany. To znamená, že dvojice sousedních obrazových bodů jsou součástí téhož objektu, pouze v případě, že jsou spolu spojeny v horizontálním nebo ve vertikálním směru (*obrázek 19* níže vlevo). Pro 8-připojení platí, že pixely jsou spojeny, pokud se dotýkají jejich hrany nebo rohy. To znamená, že sousední pixely jsou součástí téhož objektu, pouze v případě, že jsou spojeny v horizontálním, vertikálním nebo v diagonálním směru (*obrázek 19* níže vpravo). (Matlab 2013)



Obrázek 19 – Charakterizace 4-připojení a 8-připojení pixelů (4-connected nebo 8-connected)

Jakmile jsou v rámci metody „component labelling“ stanoveny všechny skupiny, každý pixel je označen šedým nebo barevným odstínem barev (barevné značení neboli „color labelling“) podle části k níž byl objekt přidělen. (Matlab 2013)

Metoda „component labelling“ je v programovém prostředí Matlab realizována voláním funkce „bwlablel“ s parametrem 8-konektivity s následným voláním funkce „label2rgb“, čehož výsledkem je barevné znázornění matice objektů (příklad je uveden na *obrázku 20* níže, Matlab 2013).



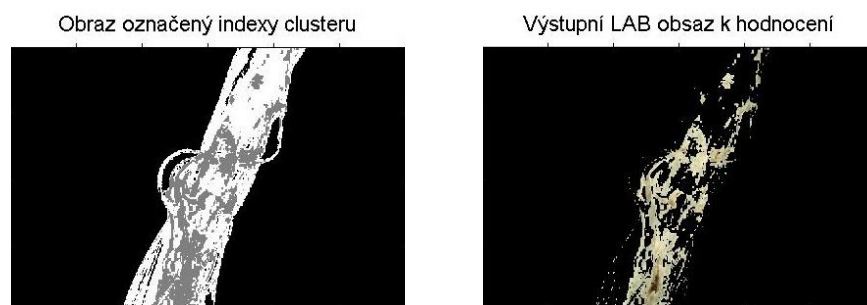
Obrázek 20 – Příklad komponentního značení (component labelling) v Matlabu

2.5.2. Shlukovací algoritmus K-Means

K-Means je shlukovací (clustering) algoritmus užívaný k určení přirozených barevných seskupení vyskytujících se v sadě dat. Jedná se o metodu, která rozděluje objekty do k vzájemně jedinečných shluků, kde k je počet shluků, které mají být v datech lokalizovány. Nevýhodou tohoto shlukovacího algoritmu je v některých případech časová náročnost, způsobená vykonáváním iterací a nezbytným zadáním vstupních podmínek uživatelem (Pelleg and Moore, 2000). Algoritmus K-Means přiřazuje každému objektu pozici v prostoru. Pro měření barevných vzdáleností se pak užívá Euklidovská vzdálenost, a to v barevném prostoru CIE L^*a^*b (v barevném prostoru RGB měření vzdálenosti z principu možné není). Využívá se především složek ' a^*b^* ', kde se nacházejí informace o barvě

(Chitade, 2010; Pelleg and Moore, 2000). Seskupené objekty v rámci každého shluku jsou od sebe ve shluku minimálně vzdáleny a co nejvíce vzdáleny od ostatních objektů jiného shluku, vše v závislosti na zvoleném počtu barev/shluků (při zanedbání změny jasu). K-Means algoritmus je možné využívat při redukci barevné palety obrazu, dělení dat do podmnožin, třídění dokumentů, v modelování například k vytváření skupin objektů (dat) s podobnými rysy chování (podobnou charakteristikou), (Matlab 2013).

Shlukovací algoritmus K-Means je v programovém prostředí Matlab realizován voláním funkce „kmeans“ (s parametry Euklidovské metriky pro měření vzdáleností).



Obrázek 21 – Příklad shlukovacího algoritmu K-Means v Matlabu

2.6. Charakterizace oblastí

Parametry popisující strukturu biofilmu je možné rozdělit na texturní, které popisují heterogenitu snímku, a plošné, které popisují morfologické vztahy (například mezi orientací a tvarem povrchových znaků). Z šedo-tónových snímků (barevná škála 0 až 255) se počítají texturní parametry; plošné parametry jsou počítány ze snímků binárních (barevná škála 0 nebo 1). (Lewandowski and Beyenal, 2007; Yang et al., 2000)

2.6.1. Plošné parametry

Parametry plochy popisují morfologickou strukturu biofilmu, zejména velikost, tvar a orientaci podstatných částí. Každý z parametrů měří charakteristiku plochy buněčného shluku, nebo volný neobsazený prostor v biofilmu. Z tohoto důvodu je nezbytné pomocí obrazové analýzy oddělit buněčné shluky od neobsazeného prostoru, což se provádí segmentací obrazu (Yang et al., 2000; Lewandowski 2007).

1) Plošná porozita a Eulerovo číslo

Parametr plošná porozita naznačuje, jak je objekt porézní; parametr je definován jako poměr prázdné plochy k celé ploše (2), poměr se snadno získá z binární matice snímku biofilmu (Yang et al., 2000; Lewandowski 2007).

$$\text{Plošná porozita} = \frac{\text{Počet_prázdných_pixelů}}{\text{Celkový_počet_pixelů}} \quad (2)$$

$$\text{Plošné zaplnění} = 1 - \text{Plošná porozita} = \frac{\text{Počet_zaplněných_pixelů}}{\text{Celkový_počet_pixelů}} \quad (3)$$

Kde parametr „počet prázdných pixelů“ odpovídá počtu pixelů pozadí, parametr „počet zaplněných pixelů“ odpovídá počtu pixelů identifikovaných objektů. Hodnota porozity se pohybuje v rozmezí 0 (pokud objekt neobsahuje žádné otvory) až 1 (v obraze neexistují žádné objekty, obraz je prázdný). Když je hodnota větší než nula indikuje to, že se uvnitř objektu vyskytují póry. Často se parametr vyjadřuje v procentech, 0 % až 100 %.

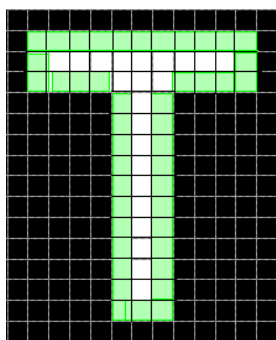
Doplňkem k parametru porozity je parametr plošné zaplnění (3), který je měřítkem například obsazenosti povrchu biofilmem, kde 0 odpovídá obrazu, v němž se nevyskytují žádné objekty, 1 odpovídá obrazu, který je celý zaplněn objektem (objekt neobsahuje póry).

Eulerovo číslo je skalární hodnota, která určuje počet objektů v dané oblasti mínus počet otvorů v této oblasti. Pro výpočet se využívá 4-konektivity nebo 8-konektivity (8-okolí), (viz *obrázek 19*). V rámci hodnocení Eulerova čísla je pro jeden objekt výsledkem počet otvorů v daném objektu. V Matlabu je výpočet Eulerova čísla prováděn voláním funkce „regionprops“ s parametrem „EulerNumber“. (Matlab 2013)

2) Obvod a obsah

Obvod je skalár, který určuje vzdálenost kolem regionu (oblasti, objektu), vzdálenost mezi každým párem přilehlých obrazových bodů kolem hranice regionu. Následující *obrázek 22* znázorňuje pixely obsažené v obraze, při výpočtu obvodu pro daný objekt. Obvod objektu je délka hranice obrazu, která tvoří předěl mezi objektem a pozadím. Je definována pro 4-konektivitu nebo 8-konektivitu, v závislosti na zvoleném postupu (viz *obrázek 19*). (Matlab 2013)

Parametr obsah objektu je skalár, který určuje počet pixelů uvnitř regionu (oblasti, objektu). Na *obrázku 22* je obsah roven součtu všech nečerných pixelů (tj. jedná se o součet vnitřních pixelů a pixelů determinujících obvod).



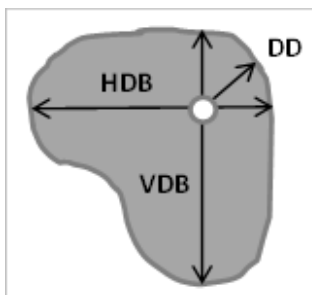
Obrázek 22 – Znázornění výpočtu parametru obvodu a obsahu v prostředí Matlab (Matlab 2013)

3) Délka běhu (horizontální, vertikální)

Průměrná délka běhu (horizontální/vertikální) je průměrem hodnot pixelů shluků biomasy nacházejících se ve snímku nepřetržitě za sebou. Průměrná horizontální délka běhu je průměrem počtu po sobě jdoucích pixelů, s hodnotou jedna (buněčný shluk) v řadě. Obdobně je definována

průměrná vertikální délka běhu. Průměrná délka běhu měří očekávaný rozměr buněčného shluku v každém směru, užívá se například při určování „preferenčního“ růstu bakteriální populace. Jedná se o bezrozměrnou jednotku (Lewandowski and Beyenal, 2007; Yang et al., 2000; Cenens et al., 2002).

0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	1	1	0	0
0	0	1	1	1	0	0
0	1	1	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	0
0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0



Obrázek 23 – Matice výpočtu horizontální a vertikální délky běhu a dané znázornění v buněčném shluku (Yang et al., 2000)

V binárním snímku biofilmu je jedničkou značen shluk pixelů. Průměrná horizontální délka běhu je $(3 + 3 + 5 + 5)/4 = 4$ (pixelů). Průměrná vertikální délka běhu je $(2 + 4 + 4 + 4 + 2)/5 = 3.2$ (pixelů). (Lewandowski and Beyenal, 2007)

4) Orientace

Orientace je skalární úhel ve stupních v rozsahu (-90 až +90 stupňů). Jde o úhel mezi osou-x a hlavní osou eliptického objektu. Hodnoty +90° a -90° odpovídají vertikálně orientovanému objektu, hodnoty kolem 0° odpovídají horizontálně orientovanému objektu. Orientace kruhovitých objektů je rovna 0°. (Matlab 2013)

Obrázek 24 níže ilustruje osy elipsy a její orientaci. Levý obraz znázorňuje detekovaný objekt a jemu odpovídající elipsu. Pravý obrázek ukazuje stejnou elipsu s grafickým znázorněním, kde plné modré čáry jsou osy elipsy a červené tečky jsou ohniska elipsy. Orientace je pak úhel mezi horizontální tečkovanou čarou a hlavní osou elipsy, přičemž hlavní osa elipsy prochází ohnisky elipsy. V Matlabu je výpočet orientace prováděn voláním funkce „regionprops“ s parametrem „Orientation“. (Matlab 2013)



Obrázek 24 – Znázornění výpočtu parametru orientace v prostředí Matlab (Matlab 2013)

5) Kruhovitost a excentricita

Kruhovitost je měřítkem protáhlosti objektu. Parametr je definován jako poměr plochy objektu k ploše kruhu o průměru, který je roven délce objektu (4). Kruhovitost kruhu je rovna 1, hodnota se snižuje pro jakékoli jiné objekty. (Cenens et al., 2002) Hlavní vzorec vychází z myšlenky $Kruhovitost = 1 \rightarrow Kruhovitost \cdot Obsah = Obsah \rightarrow Kruhovitost \cdot (\pi \cdot Poloměr^2) = Obsah \rightarrow$

$$Kruhovitost = \frac{4 \cdot \text{Obsah}}{\pi \cdot (4 \cdot \text{Poloměr}^2)} = \frac{4 \cdot \text{Obsah}}{\pi \cdot (2 \cdot \text{Poloměr})^2} = \frac{4 \cdot \text{Obsah}}{\pi \cdot \text{Délka}^2} \quad (4)$$

Excentricita (výstřednost, nesoustřednost) je skalár, který určuje výstřednost eliptického objektu. Excentricita je poměr mezi vzdáleností ohnisek elipsy a délkou hlavní osy elipsy. Hodnota excentricity se pohybuje v rozmezí (0 až 1). Hodnota 0 odpovídá kruhu, hodnota 1 odpovídá úsečce. V Matlabu je výpočet excentricity prováděn voláním funkce „regionprops“ s parametrem „Eccentricity“. (Matlab 2013)

6) Ekvivalentní průměr kruhu

Ekvivalentní průměr kruhu (EqD) je parametr, který představuje průměr kružnice, která by měla ekvivalentní plochu jako daný objekt. Používá se k charakterizaci částic nepravidelného tvaru (5). Jde o jeden z velice vhodných parametrů pro hodnocení velikostí objektů. (Cenens et al., 2002).

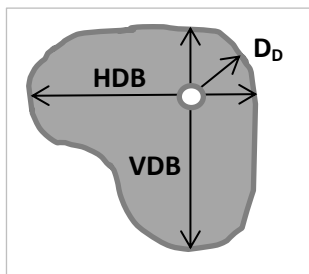
Hlavní vzorec vychází z myšlenky $EqD = 2 \cdot \text{Poloměr} \rightarrow EqD^2 = 4 \cdot \text{Poloměr}^2 \rightarrow$

$$\frac{EqD^2}{4} = \frac{\pi \cdot \text{Poloměr}^2}{\pi} \rightarrow \frac{EqD^2}{4} = \frac{\text{Obsah}}{\pi} \rightarrow EqD = 2 \cdot \sqrt{\frac{\text{Obsah}}{\pi}} \quad (5)$$

7) Difuzní vzdálenost

Difuzní vzdálenost (D_D diffusion distance) je měřítkem minimální vzdálenosti ze středu shluku buněk do neobsazeného prostoru, nejbližšího prázdného pixelu ve snímku. (Yang et al., 2000). Existují tři měřítka difuzní vzdálenosti, průměrná, minimální a maximální. Průměrná difuzní vzdálenost je průměrem minimálních vzdáleností difuze z každého pixelu shluku do nejbližšího prázdného pixelu, vztaženo na všechny shluky pixelů ve snímku. Maximální difuzní vzdálenost je vzdálenost z nejvzdálenějšího pixelu ve shluku pixelů do nejbližšího prázdného shluku. Minimální vzdálenost může být např. měřítkem vzdálenosti zdroje živin nebo kyslíku pro buňku. Větší difuzní vzdálenost indikuje větší vzdálenost, kterou musí substrát doputovat (difundovat) ve shluku buněk. (Lewandowski and Beyenal, 2007; Yang et al., 2000). Difuzní vzdálenost se vypočítává pomocí Euklidovské vzdálenosti (6). (Yang et al., 2000).

$$D_D = \sqrt{x^2 + y^2} \quad (6)$$



Obrázek 25 – Znárodnění shluku buněk (difuzní vzdálenost (D_D), horizontální délka běhu (HRL), vertikální délka běhu (VRL) dle (Yang et al., 2000)

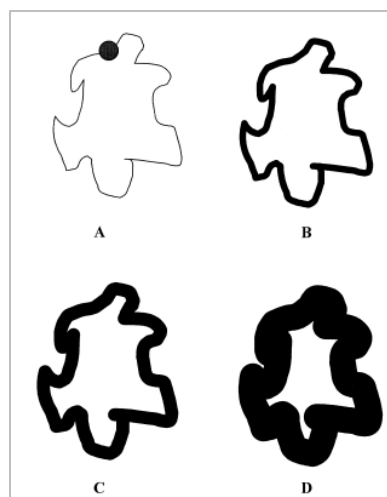
8) Fraktální dimenze

Fraktální dimenze objektu se používá pro charakterizaci obrysu a jeho nepravidelností. Ve 2D prostoru měří fraktální geometrie stupeň nepravidelnosti hranice objektu, fraktální rozměr se

pohybuje mezi hodnotami 1 a 2 (pro 2D obraz; 1 až 3 pro 3D obraz). Při užití v obrazové analýze biofilmu je zřejmé, že čím více jsou hranice biofilmu (obecně buněčného seskupení) nepravidelné, tím vyšší je fraktální dimenze (Yang et al., 2000; Petrou 2006). Fraktální dimenze je míra nerovnosti (drsnoty) hranice buněčných skupin (clusterů), k hodnocení se využívá rostoucí dilatace kruhu, výsledek je určen logaritmickým vztahem mezi obvodem a poloměrem dilatovaného kruhu (obrázek 27, Beyenal et al., 2004).

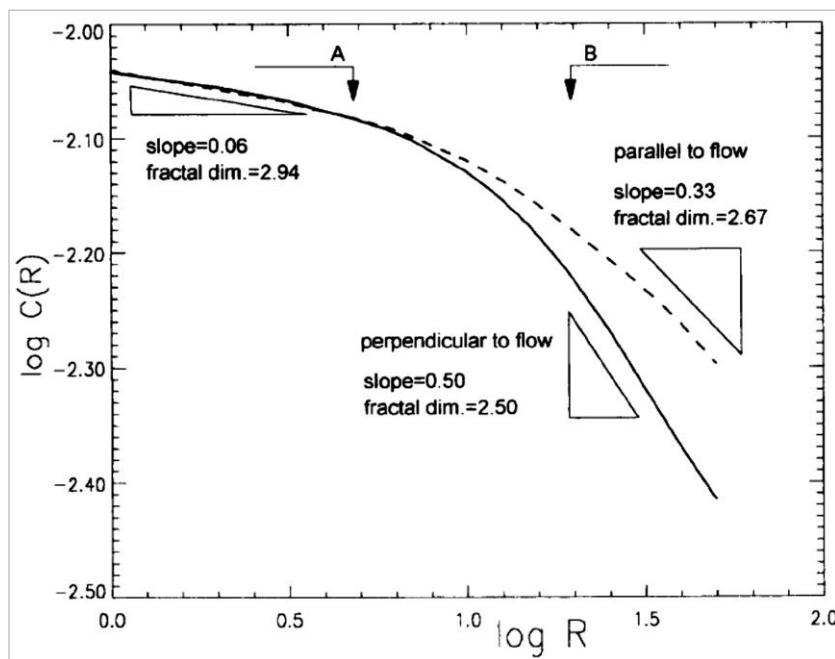
Koncepce fraktální geometrie byla zavedena již Mandelbrotem (1977, 1982). Dnes se pro výpočet fraktální dimenze užívá metoda Minkowski. Metoda měří fraktální dimenzi určováním míry změny v hranici objektu tím, jak vzrůstá tloušťka hranice. Opakováním se dlouhé a nepravidelné hranice stávají kratšími, jak jsou užívány silnější hranice, jsou vyhlazovány nepravidelnosti (obrázek 26). Tento postup při zpracování obrazu je popisován jako dilatace. Při dilataci je užito dilatačního kruhu, který se neustále pohybuje po hranici. Pohybem kruhu po hranicích dochází k vyhlazování linie hranice (Yang et al., 2000; Lewandowski 2007; Petrou 2006). Vypočtení je prováděno nastavením pixelů hranice na nulu a všech ostatních na jedna. Posléze je spočtena Euklidovská vzdálenost, čímž se získá vzdálenost každého pixelu od hranice. Velikost dilatované oblasti lze zjistit spočtením pixelů, které jsou menší než poloměr zvoleného dilatačního kruhu. Z toho vyplývá, že hranice se vypočte dle (Yang et al., 2000) následovně

$$\text{Hranice} = \frac{\text{dilatovaná oblast}}{\text{průměr kruhu}} \quad (7)$$



Obrázek 26 - Dilatace pomocí dilatačních kruhů různých průměrů (Yang et al., 2000)

Vykreslením grafu hranice (resp. obvod) objektu vs. průměr dilatovaného kruhu, obojí v logaritmickém měřítku, získáme lineární funkci. Vhodným proložením dat přímkou získáme hodnotu sklonu křivky (tzv. slope). Příklad tohoto postupu je zobrazen na obrázku 27 níže (Hermanowicz et al. 1995).



Obrázek 27 – Příklad grafu fraktální dimenze pro 3D obraz (Hermanowicz et al. 1995)

Křivka $C(R)$ (hranice, resp. obvod) ukazuje, že struktura biofilmu má alespoň dvě různá geometrická měřítka (A, B). V malém měřítku (region A) je struktura biofilmu kompaktní, biofilm téměř dokonale vyplnil prostor, fraktální dimenze je rovna hodnotě 2.94 ($= 3 - 0.06$). Pro srovnání, větší agregáty biomasy (region B) měly menší rozměry fraktální dimenze (2.67), což nasvědčuje méně kompaktním objektům. Tento výsledek dle (Hermanowicz et al. 1995) je v obecné shodě s kvalitativním vyjádřením podle (de Beer et al., 1994).

Obecně platí, že malé agregáty (struktury menší než 5 μm) biomasy jsou poměrně kompaktní a izotropní, jak indikuje fraktální dimenze blízká 2 pro 2D obraz (blízká 3 pro 3D obraz). Větší struktury s lineárními rozměry větší než 20 μm bývají méně kompaktní, s menší fraktální dimenzí. (Hermanowicz et al. 1995)

9) Solidita

Solidita (pevnost) je skalární hodnota, která určuje podíl pixelů v konvexní obálce daného objektu. Konvexní obálka je definována jako průnik všech polorovin, které obsahují objekt, tj. nejmenší konvexní množina, která pokrývá objekt. Názorně je příklad konvexní obálky uveden na *obrázku 28*. Solidita je vypočítána dle následující rovnice (Matlab, 2013).

$$\text{Solidita} = \frac{\text{Plocha}}{\text{Konvexní obálka}} \quad (8)$$

Parametr solidita je pro kruhovitý objekt roven 1 (plocha objektu = konvexní obálka), pro ostatní tvary či seskupení, bude hodnota solidity menší než 1. V Matlabu je výpočet solidity prováděn voláním funkce „regionprops“ s parametrem „Solidity“. (Matlab 2013)



Obrázek 28 – Příklad konvexní obálky objektů (Matlab, 2013)

2.6.2. Texturní parametry

Texturní parametry měří heterogenitu v biofilmu tím, že porovnávají velikost, pozici a/nebo orientaci složek biofilmu (vizuálních komponent). Parametry jsou počítány z 8-bitových snímků škály šedé, kde je každý pixel ohodnocen 0 až 255. Textura je definována jako směr změny barevnosti snímku, může být popsána jako jemná, hrubá, náhodná, vlnitá, nepravidelná atd. Texturu lze také definovat jako opakující se vzor střídání intenzity snímku. Texturní parametry měří změnu škály šedé v buněčném shluku a v okolním prostoru na základě pravděpodobnosti toho, že se v okolí budou nacházet pixely stejného, nebo podobného typu (Yang et al., 2000).

Pro analýzu okolí se používají parametry textury (Yang et al., 2000; Lewandowski 2007) jako například entropie textury, energie a homogenita. Tyto parametry textury se vypočítávají z tzv. „kookurenční matice“, která obsahuje informace o pozicích pixelů, které mají shodnou hodnotu škály šedé.

1) Výpočet co-occurrence matice (matice souběžného výskytu)

Co-occurrence matice je matice přechodu generovaná změnami intenzity pixelů (Chang et al., 1994), která popisuje všechny přechody z intenzity šedých hodnot (i) na šedé hodnoty (j). Jedná se o dvoudimenzionální reprezentaci pravděpodobnosti šedé úrovně změny v obraze (Yang et al., 2000, Petrou 2006). Existují dva způsoby, kterými lze definovat co-occurrence matici. První přístup je definován směrově, druhý definuje matici jako rotačně invariantní. Konstrukce rotačně invariantní co-occurrence matice je uveden dle rovnice (9), matice je parametrizována pouze podle vzdálenosti d , a lze získat tolik matic, kolik je různých vzdáleností (vzdálenost dvojice bodů d od sebe navzájem, bez ohledu na orientaci; Petrou 2006).

$$C(k, l, d) = \sum_i \sum_j \sum_{\vec{n}} \delta\{k - g(i, j)\} \delta\{l - g((i, j) + d\vec{n})\} \quad (9)$$

kde \vec{n} je jednotkový vektor směřující ve zvoleném směru, $g(i, j)$ je šedá hodnota pixelu (i, j) , $g((i, j) + d\vec{n})$ je šedá hodnota pixelu, který je ve vzdálenosti d od pixelu (i, j) a ve směru dle orientace definované jednotkovým vektorem \vec{n} , a $C(k, i, d)$ je celkový počet párů pixelů ve vzdálenosti d od sebe identifikovaných v obraze, takových že první z nich má šedou hodnotu k a druhý šedou hodnotu l . Ve výše uvedeném vyjádření $\delta(a - b)$ má hodnotu 1, pokud $a = b$, je-li $a \neq b$ pak $\delta(a - b)$ má hodnotu 0 (Petrou 2006).

2) Matice prostorové závislosti

Co-occurrence matice je spočtena z matic prostorové závislosti v horizontálním a vertikálním směru. Matice prostorové závislosti v horizontálním a vertikálním směru popisují intenzitu změny v jejich příslušném směru (Yang et al., 2000; Lewandowski 2007).

Horizontální			
0	0	0	1
0	0	0	1
2	3	0	0
2	2	2	3
Vertikální			

Obrázek 29 – Příklad maticového znázornění biofilmu 4 x 4 se čtyřmi hodnotami škály šedé (0 – 3), vstup pro matici prostorové závislosti (Yang et al., 2000; Lewandowski 2007)

Horizontální matice prostorové závislosti ze snímků:

$$P_H = \{p_H(a, b)\} = \begin{bmatrix} p_H(0.0) & p_H(0.1) & p_H(0.2) & p_H(0.3) \\ p_H(1.0) & p_H(1.1) & p_H(1.2) & p_H(1.3) \\ p_H(2.0) & p_H(2.1) & p_H(2.2) & p_H(2.3) \\ p_H(3.0) & p_H(3.1) & p_H(3.2) & p_H(3.3) \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 10 & 2 & 0 & 1 \\ 2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 4 & 2 \\ 1 & 0 & 2 & 0 \end{pmatrix} \quad (10)$$

$p_H(0,0)$ je počet změn škály šedé z 0 na 0 v horizontálním směru. Je zde pět změn z 0 na 0 ve směru zleva doprava a také pět zprava doleva, $p_H(0,0)$ je tedy rovno 10. $p_H(0,1)$ je počet změn škály šedé z 0 do 1 v horizontálním směru, a podobně.

Obdobně se vypočte vertikální matice prostorové závislosti:

$$P_V = \{p_V(a, b)\} = \begin{bmatrix} p_V(0.0) & p_V(0.1) & p_V(0.2) & p_V(0.3) \\ p_V(1.0) & p_V(1.1) & p_V(1.2) & p_V(1.3) \\ p_V(2.0) & p_V(2.1) & p_V(2.2) & p_V(2.3) \\ p_V(3.0) & p_V(3.1) & p_V(3.2) & p_V(3.3) \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} 8 & 1 & 2 & 2 \\ 1 & 2 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 2 & 1 \\ 2 & 0 & 1 & 0 \end{pmatrix} \quad (11)$$

Výsledná matice prostorové závislosti je sumou horizontální a vertikální matice prostorové závislosti:

$$P_{HV} = P_H + P_V = \{p_{HV}(a, b)\} = \begin{pmatrix} 18 & 3 & 2 & 3 \\ 3 & 2 & 0 & 0 \\ 2 & 0 & 6 & 3 \\ 3 & 0 & 3 & 0 \end{pmatrix} \quad (12)$$

Normalizace je provedena sumou všech elementů a vydělením každého elementu sumou:

$$sum = \sum_a \sum_b p_{HV}(a, b) = 48 \quad (13)$$

$$P_N = \{p(a, b)\} = \begin{pmatrix} 0.375 & 0.063 & 0.042 & 0.063 \\ 0.063 & 0.042 & 0 & 0 \\ 0.042 & 0 & 0.125 & 0.063 \\ 0.063 & 0 & 0.063 & 0 \end{pmatrix} \quad (14)$$

3) Entropie, energie, homogenita

Na základě normalizované matice prostorové závislosti P_N jsou dále texturní parametry definovány jako:

$$\text{Entropie textury} = - \sum_{a,b} \sum_{P(a,b) \neq 0} p(a, b) \ln(p(a, b)) \quad (15)$$

Texturní entropie je míra náhodnosti v šedo-tónové stupnici barev. Čím vyšší je texturní entropie, tím více je obraz heterogenní (Beyenal et al., 2004). Pojem entropie je často používán i v jiných vědách. Entropie dat (definováno dle Shannon, 1948), měří nejistotu informací, kdy zvýšení entropie je spojena se ztrátou informací. Entropie ve vědách jiných než v termodynamice je bezrozměrná jednotka. *Obrázek 30a* je prázdný (bez struktury), skládá se pouze z bílých pixelů. Entropie vypočtená pro daný obraz je nulová, neexistuje rozdíl v pixelech nebo v heterogenitě v obrazu. *Obrázky 30b, c, d* obsahují stále většího počtu klastrů (objektů) a entropie se zvýší odpovídajícím způsobem (*tabulka 2*, Lewandowski and Beyenal, 2007).

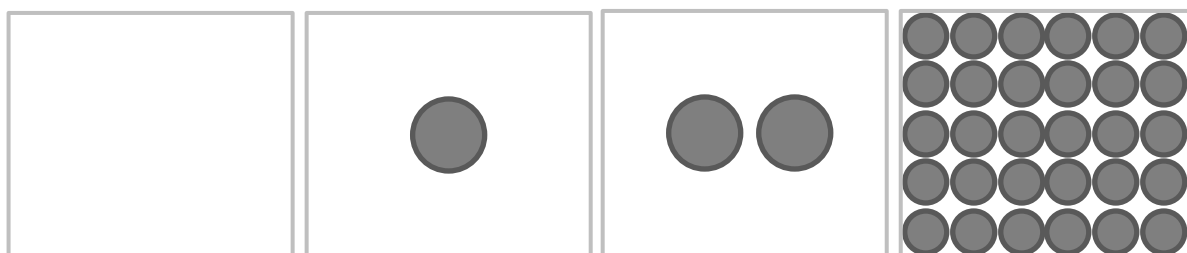
$$\text{Energie} = \sum_a \sum_b \{p(a, b)^2\} \quad (16)$$

Energie měří pravidelnost ve vzorcích pixelů a jejich citlivost na orientaci klastrů pixelů a podobnost jejich tvarů. Energie je míra směrově se opakujících vzorů pixelů. (Beyenal et al., 2004) Parametr je citlivý na podobnost obrazových bodů klastrů (jejich tvarů). Menší hodnoty energie znamenají časté a opakované vzory klastrů pixelů a vyšší energie znamená více homogenní strukturu obrazu s menším počtem opakovaných vzorů, větší směrovou jednotnost. (Beyenal et al., 2004) Podmínky energie a entropie se používají většinou v jiných vědách než biologie, ale i zde je jejich význam obdobný jako v termodynamice (nejdou však totožné). V analýze obrazu byl termín energie představen již v práci (Haralick et al., 1973). Energie ve vědách jiných než v termodynamice je bezrozměrná jednotka. Na *obrázku 30a* je energie roven jedné, v obraze neexistují žádné opakující se vzory. Jak se počet opakujících klastrů zvyšuje (*obrázek 30 b, c, d*), klesá hodnota energie (*tabulka 2*, Lewandowski and Beyenal, 2007).

$$\text{Homogenita} = \sum_a \sum_b \frac{1}{1+(a+b)^2} p(a, b) \quad (17)$$

Homogenita měří podobnost prostorově blízkých obrazových struktur. Vyšší homogenita znamená více stejnorodou strukturu obrazu. Homogenita je normalizována s ohledem na vzdálenost mezi změnami ve struktuře, ale je nezávislá na umístění klastrů pixelů v obraze. Hodnoty homogenity značí větší, či menší změny v kontrastu snímku. (Beyenal et al., 2004) Na *obrázku 30a* je homogenita rovna jedné, což prokazuje, že v obraze neexistují žádné další prostorové vzory. Parametr homogenity klesá s rostoucím počtem vzorků (*tabulka 2*, Lewandowski and Beyenal, 2007).

Definice homogenity a energie jsou podobné, ale význam těchto parametrů je odlišný. Pokles homogenity je způsoben opakujícím se vzorem pixelových shluků, zatímco pokles energie je způsoben směrovými změnami ve struktuře pixelů klastrů v obraze.



Obrázek 30 – Náhodně generovaný obraz pro přehled texturních parametrů obrazu, a) prázdný obraz, b) jeden kruhový objekt v obraze, c) dva kruhové objekty v obraze, d) mnoho objektů v obraze (Lewandowski and Beyenal, 2007)

Tabulka 2 – Přehled vypočtených texturních parametrů (Lewandowski and Beyenal, 2007)

Obráz	Počet objektů	Entropie	Energie	Homogenita
30 a	0	0	1	1
30 b	1	0.60	0.78	0.94
30 c	2	1.02	0.59	0.88
30 d	30	1.97	0.19	0.66

F PRAKTICKÁ ČÁST

Fa. MATERIÁLY, METODY, EXPERIMENTÁLNÍ SET-UP

1.1. Odpadní voda a její hodnocení

Laboratorní ověřování nosičů probíhalo v širokém rozsahu rozhodných technologických parametrů (doba zdržení odpadní vody, teplota, salinita). Cílem verifikace s reálnými odpadními vodami bylo především potvrzení vhodnosti aplikace nanovlákného nosiče na BČOV (stabilita, kolonizovatelnost, schopnost regenerace).

V předkládané disertační práci je pozornost věnována třem typům odpadních vod. První testovaná reálná voda obsahovala kyanidy, anilin a diphenylguanidine. Druhá reálná voda obsahovala především fenoly, kresoly a dimethylfenoly. Třetí reálná voda obsahovala zejména Chloramin B, detailní parametry testovaných odpadních vod jsou uvedeny níže.

1.1.1. Detekce koncentrace polutantů

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)

Suma všech organických látek ve vodě (pro hodnocení anilin, kyanidy, DPG, fenoly, chloraminy) byla měřena jako hodnota chemické spotřeby kyslíku (CHSK v jednotkách mg/l), a to jedno-účelovými kyvetovými testy výrobce Hach-Lange (dle měřeného rozsahu se jednalo o testy typu LCK 314, LCK 414, LCK 514; zdroj: Informační leták ke kyvetovým testům Hach-Lange).

Při laboratorním stanovení CHSK byly využity jednoúčelové testy COD (Chemical Oxygen Demand, výrobce Hach-Lange), které jsou založeny na využití dichromanové metody. Oxidace probíhá v silně kyselém prostředí za dvouhodinového varu. Oxidovatelná složka reaguje s kyselinou sírovou, roztok dichromanu draselného reaguje v přítomnosti síranu stříbrného (Ag^+), jako katalyzátoru. Za těchto podmínek dochází k oxidaci i velmi stabilních látek. Stanovení je silně rušeno přítomností chloridů (maximální hranice koncentrace pro tyto testy je 1500 mg/l chloridů). Tyto ionty jednak tvoří sraženinu s katalyzátorem (Ag^+), jednak podléhají oxidaci s dichromanem, což vede k pozitivní chybě stanovení. Jejich přítomnost je nutné maskovat síranem rtuťnatým (Hg^{2+}). Redukce probíhá ve žlutém zbarvení, k vyhodnocení hodnoty CHSK je užito spektrofotometrické stanovení Cr^{6+} . Dichromanová metoda je použitelná pro sledování všech vod, i odpadních. Tuto metodu lze použít pro vzorky s koncentrací chloridů do 5000 mg/l, případně je nutné vzorky ředit. (zdroj: Informační leták ke kyvetovým testům Hach-Lange, Chemický a fyzikální rozbor vody)

Celkové fenoly

Koncentrace fenolu byly stanovovány kyvetovými testy výrobce Hach-Lange (dle měřeného rozsahu se jednalo o testy typu LCK 345, LCK 346; zdroj: Informační leták ke kyvetovým testům Hach-Lange).

Princip metody je založen na reakci vzorku s 4-nitroanilinem za vzniku žlutého (až rudého) komplexu. Zabarvení je vyhodnoceno spektrofotometrickým stanovením. Rozsah použití metody je pro vodu, odpadní vodu i půdu. Měřicí rozsah je 0.05 – 3.00 mg/l. Vzorek musí být před analýzou filtrován přes membránový filtr (odstranění případného zákalu), pH hodnoceného vzorku musí být upraveno do rozmezí 2 – 10, teplota vzorku a činidel musí být v rozmezí 15 – 25 °C.

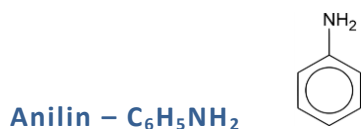
Celkový chlór

Hodnocení Chloraminu B bylo prováděno metodou hodnocení celkového chlóru ve vodě, výrobce Hach-Lange (jednalo o testy typu 2105669 Chlor celkový, polštářky s práškem; zdroj: Informační leták ke kyvetovým testům Hach-Lange).

Chlór může být ve vodě přítomen jako volný chlor nebo jako vázaný chlor. Ve stejném roztoku mohou existovat obě formy a sumárně mohou být určeny jako chlor celkový. Volný chlor je přítomný jako kyselina chlorná nebo chlornanový iont. Vázaný chlor představuje kombinaci obsahující sloučeniny chloru, včetně monochloraminu, dichloraminu, trichloridu dusíku a další deriváty chloru. Vázaný chlor oxiduje jodid (I^-), na jod (I_2). Jod a volný chlor reaguje s DPD (N, N-diethyl-p-fenylendiamin) za vzniku červeného roztoku. Intenzita zabarvení je úměrná celkové koncentraci chloru. Zabarvení je vyhodnoceno spektrofotometrickým stanovením.

1.1.2. Anilin, kyanidy, DPG

Pro laboratorní ověření vyvíjeného nanovláknenného nosiče byl zvolen reálný případ čištění OV z výroby difenylguanidinu (DPG) produkovaného v Lučebních závodech Draslovka a.s. Kolín. Reálná odpadní voda představuje případ extrémní specifické kontaminace organickými i anorganickými látkami o vysoké salinitě; modelová voda obsahuje pouze čistý anilín. Detailní parametry reálné a modelové odpadní vody jsou uvedeny níže. Koncentrace organických látek je sumárně vyjádřena jako hodnota chemické spotřeby kyslíku (CHSK v jednotkách mg/l).

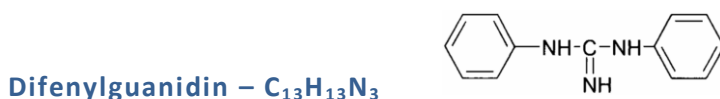


Anilin (aminobenzen, benzenamin, fenylamin), je bezbarvá olejovitá kapalina. Na vzduchu se snadno oxiduje a barví se na žlutou až hnědou barvu. Jedná se o organickou zásadu. V přírodě se nachází v černouhelném dehtu, průmyslově se vyrábí redukcí nitrobenzenu. Patří mezi hořlavé látky, těká už při pokojové teplotě. Je málo rozpustná ve vodě, ale rozpustná v organických rozpouštědlech. Anilin je zdraví škodlivá látka, náleží do skupiny aromatických uhlovodíků a odvozuje se od něho asi 300 chemických látek. Jeho deriváty jsou využívány v organických syntézách barviv, v gumárenském průmyslu při výrobě syntetického kaučuku a gumy, jako urychlovače vulkanizace. V současnosti má tato látka největší využití jako reakční komponenta při výrobě polyuretanů. V chemickém průmyslu

se používá k výrobě herbicidů, fungicidů, zvířecích repelentů, defoliantů a ve farmaceutickém průmyslu k výrobě antipyrinu, antifebrinu a acetanilidu. Anilin je už dlouhou dobu považován za toxickou a karcinogenní látku a má vysoký toxický potenciál pro vodní prostředí. Způsobuje mnoho dalších zdravotních problémů, jako jsou: zvracení, poškození jater, nádory na močovém měchýři atd. (www.wikipedia.org a www.irz.cz, 2010 – 2012; O'Neil et al., 2000).



Kyanidy jsou bílé krystalické látky, které obsahují v molekule uhlík a dusík. Kyanid sodný a kyanid draselný jsou nejběžněji se vyskytující látky této skupiny. Kyanidy jsou rozpustné ve vodě i v alkoholu. Ve styku s vodou mohou mít zápach po kyanovodíku (mandlový) i po amoniaku (štiplavý). Po okyselení se z kyanidů uvolňuje kyanovodík (prudce jedovatý plyn). Kyanidy jsou používány v metalurgii, chemickém a fotografickém průmyslu a při výrobě plastů (nylon). Dále je jich využíváno při výrobě pryží, výbušnin a vykuřovacích prostředků. Kyanid sodný a draselný jsou důležité prostředky při elektrochemickém pokovování a tvrzení oceli. Kyanidy mohou být používány i pro extrakci zlata a stříbra z minerálů v těžebním průmyslu. V případě, že se kyanidy dostanou do vody či půdy, nejsou stálé, jejich bioakumulace ve vodních organismech je proto nepravděpodobná. Podléhají mikrobiologickému rozkladu. Kyanidy se neváží na částice půdy, a mohou se proto vyluhovat do podzemních vod. Kyanidy jsou vysoce toxické pro ryby a ostatní vodní organismy. Všechny kyanidy působí na aerobní organismy jako jedy narušující vázání kyslíku dýchacími enzymy. Při vysokých koncentracích jsou kyanidy toxické pro různé půdní mikroorganismy i pro ostatní formy života. (www.irz.cz, 2012)



Difenylyguanidin (DPG) je bílá krystalická látka, která obsahuje v molekule uhlík a dusík. DPG se vyrábí reakcí plynného chlorkyanu s anilinem (www.registrpovinnosti.com, 2012). Je velmi málo rozpustný ve vodě, rozpustný v alkoholu, chloroformu, horkém benzenu, horkém toluenu; rychle je rozpustný ve zředěných minerálních kyselinách. Vodné roztoky jsou silně alkalické. Látka je zdraví škodlivá při požití, dráždí oči, dýchací orgány a kůži. Je silně toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí. Difenylyguanidin se používá jako akcelerator vulkanizace pneumatik v gumárenství. (Ducháček a Hrdlička, 2009)

a) Reálná odpadní voda

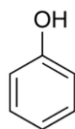
CHBČOV Lučební závody Draslovka a.s. Kolín je kombinovaná chemicko-biologická čistírna projektovaná na likvidaci technologických odpadních vod z procesů výroby difenylyguanidinu (DPG). Produkované denní množství je maximálně 160 m³. Odpadní vody obsahují především anilin (500 – 2000 mg/l), DPG (500 – 800 mg/l) a kyanidy (100 – 200 mg/l), a další toxické meziprodukty (jako deriváty fenylmočoviny) a mají extrémně vysokou salinitu (až 35 g/l RAS). (Lederer, 2011) Průměrná hodnota CHSK přiváděné surové vody byla 3600 mg/l. K odpadní vodě se vždy přidávali nutrienty, a to přesněji fosfáty o koncentraci 60 mg/l K₂HPO₄ a amoniakální sůl o koncentraci 200 mg/l NH₄Cl.

b) Modelová odpadní voda

Modelová odpadní voda obsahovala pouze anilin (koncentrace dosahovala postupně 500 – 2000 mg/l) a dosahovala extrémně vysoké salinity (až 35 g/l RAS). K čisté vodě se vždy přidávali nutrienty, a to přesněji fosfáty o koncentraci 60 mg/l K_2HPO_4 a amoniakální sůl o koncentraci 200 mg/l NH_4Cl . Použitá voda byla čerpána z vodovodního řádu, takže obsahovala dostatečné množství stopových prvků. Aby voda obsahovala minimální množství chloru, byla tato ponechána alespoň jeden den na vzduchu (vytěkání chloru v odstáté vodě).

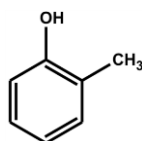
1.1.3. Fenoly, kresoly, dimethylfenoly

V laboratorních experimentech byla pozornost věnována biologickému čištění odpadních vod s vysokým obsahem fenolů, kresolů a dimethylfenolů. Použita byla reálná podzemní voda z areálu bývalé výroby fenolů. Modelová voda obsahuje pouze čistý fenol. Detailní parametry reálné a modelové odpadní vody jsou uvedeny níže. Koncentrace organických látek je vyjádřena sumárně jako hodnota chemické spotřeby kyslíku (CHSK v jednotkách mg/l).



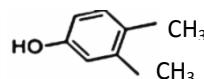
Fenol – C_6H_5OH

Fenol (též známý jako kyselina karbolová, hydroxybenzen, karbol, benzenol) je jedovatá bezbarvá krystalická pevná látka toxická pro mikroorganismy a vyšší živočichy i v nízké koncentraci, je nebezpečným kontaminantem životního prostředí. Vzhledem k tomu, že fenol a jeho deriváty jsou základní strukturní jednotkou pro řadu látek, bývá fenol jedním z nejčastějších polutantů řek i odpadních vod. Fenol se může do prostředí dostávat při rozkladu organických zbytků, nebo při lesních požárech, ale většina má průmyslový původ (rafinérie ropy, petrochemické závody, slévárny a farmaceutické závody). Používá se například při výrobě materiálů pro automobilový průmysl, barev a díky své toxicitě k plísním a bakteriím i jako desinfekční činidlo. Možnost účinného odbourání fenolu při zpracování odpadních vod má značný význam. (Pospíšilová et al., 2010).



Kresol – $CH_3C_6H_4OH$

Kresoly (též hydroxytolueny nebo methylfenoly) jsou organické sloučeniny, jejich molekuly jsou tvořeny benzenovým jádrem, na něž je vázána jedna methylová a jedna hydroxylová skupina. Podle vzájemné polohy těchto skupin rozlišujeme o-kresol (1,2), m-kresol (1,3), p-kresol (1,4). Jsou to bezbarvé krystalické látky, za normálních podmínek buď pevné, nebo kapalné. Jejich teploty tání jsou v blízkosti pokojové teploty, na rozdíl od fenolu mají méně kyselý charakter. Používá se při impregnaci dřeva, výrobě kresolformaldehydových polymerů a jako antiseptikum. Kresol je toxický pro ryby, lidi i životní prostředí (www.wikipedia.org).



Dimethylfenol – $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_3\text{OH}$

Dimethylfenol (nebo xylenol) je aromatická sloučenina se dvěma methylovými skupinami a hydroxylovou skupinou (patří mezi fenoly). Jedná se o světle-hnědou krystalickou látku, za normálních podmínek pevného skupenství, zapáchající po fenolu. Je toxický při požití a při styku s kůží, způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Je toxický pro vodní organismy a nebezpečný pro životní prostředí s dlouhodobými účinky (www.wikipedia.org; bezpečnostní list www.merckmillipore.kr).

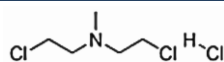
a) Reálná odpadní voda

Reálná podzemní voda z oblasti bývalé výroby fenolů obsahuje především fenoly, kresoly a dimethylfenoly s následujícím minimálním a maximálním zastoupením: fenoly (172 – 1642 mg/l), kresoly (59 – 1110 mg/l), dimethylfenoly (48 – 285 mg/l), vyšší fenoly (13 – 19 mg/l). (Lederer, 2011) Průměrná hodnota CHSK přiváděné surové vody byla 4500 mg/l. K odpadní vodě se vždy přidávali nutrienty, a to přesněji fosfáty o koncentraci 60 mg/l K_2HPO_4 a amoniakální sůl NH_4Cl o koncentraci 200 mg/l NH_4Cl .

b) Modelová odpadní voda

Modelová odpadní voda obsahovala kromě nutrientů pouze fenol (100 – 1000 mg/l). K čisté vodě se vždy přidávali nutrienty, a to přesněji fosfáty o koncentraci 60 mg/l K_2HPO_4 a amoniakální sůl o koncentraci 200 mg/l NH_4Cl . Použitá voda byla čerpána z vodovodního řádu, takže obsahovala dostatečné množství stopových prvků. Aby voda obsahovala minimální množství chloru, byla tato ponechána alespoň jeden den na vzduchu (vytěkání chloru v odstáté vodě).

1.1.4. Chloramin B



Chloramin B (známý též jako sodium N-chlorobenzenesulfonamide nebo sodium benzenesulfonchloramide), chloramin (monochloramin) je chemická sloučenina se sumárním vzorcem NH_2Cl . Obvykle se používá ve zředěném roztoku jako dezinfekce. Termín chloramin označuje skupinu organických sloučenin se vzorci R_2NCl a RNCl_2 (kde R je organická skupina). NH_2Cl se v nízké koncentraci běžně používá pro dezinfekci vody ve veřejných vodovodních sítích, jako alternativa chlorování (metoda je na vzestupu). Chlor, někdy označovaný jako volný chlor, je nahrazován chloraminem, protože chloramin je mnohem stabilnější a nerozkládá se ve vodě před tím, než se dostane ke spotřebitelům. NH_2Cl má menší tendenci reagovat s organickými materiály za tvorby chlorovaných uhlovodíků (chloroformu nebo tetrachlormethanu), které byly identifikovány jako karcinogeny. Voda upravená chloraminem není cítit po chloru a má lepší chuť. NH_2Cl je ve velkých dávkách toxický, koncentrační limit je 4 ppm. (www.wikipedia.org; bezpečnostní list www.euweb.cz) Koncentrace je vyjádřena sumárně jako hodnota chemické spotřeby kyslíku (CHSK v jednotkách mg/l).

a) Reálná odpadní voda

Reálné odpadní vody dosahovali vysokého obsahu chloraminu B (CHSK do 2600 mg/l), nižších hodnot bylo dosaženo ředěním vstupní vody z vodovodního řádu (obsahovala dostatečné množství stopových prvků). K čisté vodě se vždy přidávali nutrienty, a to přesněji fosfáty o koncentraci 60 mg/l K_2HPO_4 a amoniakální sůl o koncentraci 200 mg/l NH_4Cl .

1.2. Mikroorganismy a jejich hodnocení

1.2.1. *Rhodococcus erythropolis*

V předkládané disertační práci je pozornost věnována bakteriálním populacím, které jsou schopny přirozeně vytvářet biofilm a které jsou selektovány tak, že jejich aktivita degradovat široké spektrum polutantů je maximální. *Rhodococcus erythropolis*, přesněji kmen CCM 2595 IN byl selektována na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, Ústav biotechnologie (původně Ústav kvasné chemie a bioinženýrství).

1.2.2. Příprava inokula

V práci (pokud není psáno jinak) byla pro inokulaci využita čistá bakteriální populace rodu *Rhodococcus erythropolis*, která byla selektována a adaptována k danému polutantu (anilin, kyanidy, fenol) na pracovišti Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, Ústav biotechnologie. Inokulace do bioreaktoru probíhala v laboratořích TUL, a to přímou adaptací bakteriálního kmene k dané odpadní vodě (reálné nebo modelové), a to postupným navýšováním koncentrace hlavního polutantu. Zásobní reaktory s inokulovanou buněčnou populací byly v laboratoři uchovávány dvojím způsobem, a to buď při laboratorních teplotách kontinuální kultivací, nebo byly uchovávány v chladničce, a to buď v tří-litrových lahvích, nebo na živném agaru na Petriho miskách při teplotě 8 °C.

1.2.3. Stanovení růstu buněčné populace

Stanovení dispergovaných mikroorganismů

Koncentrace biomasy (resp. koncentrace dispergovaných mikroorganismů) byla během kultivace pravidelně určována spektrofotometrem DR-2800 firmy Hach-Lange jako změna optické density kultivačního média při vlnové délce 420 nm. Jako slepý pokus sloužila destilovaná voda, protože má stejnou hodnotu optické density jako sterilní BSM.

Stanovení sušiny

Stanovení sušiny (resp. upoutané biomasy na nosiči) probíhalo za využití chrom-sírové směsi (směs dichromanu draselného a kyseliny sírové), která sloužila jako odmašťovač a vymývač biomasy. Kolonizovaný nosič byl sušen v sušárně při teplotě 105 °C po dobu 4 hodin, poté byla odečtena hmotnost (m_1). Následně byl nosič po dobu 4 hodin ponořen do chrom-sírové směsi a za občasného míchání máčen. Nakonec byl nosič opět sušen při teplotě 105 °C po dobu 4 hodin, poté byla odečtena hmotnost (m_2). Hodnota sušiny na nosiči v gramech odpovídá rozdílu hmotností ($m_1 - m_2$).

Stanovení adheze mikrobiálních buněk k povrchu, hodnocení kolonizace

Hodnocení adheze mikrobiálních buněk k povrchu testovaných nosičů biomasy (nanovláknenný nosič, komerční nosič AnoxKaldnes) bylo v této disertační práci prováděno vyvíjenou metodikou obrazové analýzy. Vývoj této metodiky byl předmětem druhé části praktického oddílu disertační práce. Teorie byla popsána v kapitole 2 teoretické části, metodika zpracování vzorků následuje (kapitola 4, praktické části). Při hodnocení stanovení adheze mikrobiálních buněk v povrchu bylo využito optické mikroskopie.

1.2.4. Mikroskopie

Snímky bakteriálních biofilmů na nosičích biomasy byly pořízeny digitálním systémem, který se skládal z mikroskopu Olympus BX51M, digitální jednoboké zrcadlovky Olympus E-510 a počítačového softwaru QuickPHOTO MICRO 2.3. Jelikož mikroskop disponuje velice malou hloubkou ostrosti, bylo využito komerčního softwaru QuickPHOTO MICRO 2.3 s přídatným modulem Deep Focus 3.1, který využívá efektivního algoritmu, jenž je schopen vytvářet snímky s extrémní hloubkou ostrosti, což umožňuje získat jeden kompletně proostřený snímek nosiče. Jeden proostřený snímek se může skládat dokonce až ze 70 jednotlivých fotografií (počet fotografií na jeden snímek je závislý na tloušťce snímaného objektu).

Rozlišení snímaných obrazů bylo nastaveno na nejvyšší možné, tj. 3648 × 2736 pixelů (9.98 megapixelů) a data byla ukládána ve formátu JPEG. Optické zvětšení 50× (případně 200×) byly vybrány tak, aby ze vzorků mohly být získány všechny požadované informace. Pro zvětšení 50× platí měřítko (1 px = 2.933 μm), pro zvětšení 200× platí přepočít (1 px = 11.73 μm). Díky přepočtu můžeme z bezrozměrných jednotek (pixely) získat jednotky μm.

K následnému určení imobilizované biomasy byl využit naprogramovaný automatizovaný kód, který byl vytvořen v rámci předkládané disertační práce v programovém prostředí Matlab 2009b (detailnější popis tohoto hodnocení je uvedeno v praktické části, kapitola 4, Obrazová analýza biofilmových struktur).

1.2.5. Respirační testy

Měření odstraňování substrátu obsaženého v odpadní vodě je možné přímo zjišťováním rychlosti odstraňování substrátu ze směsi odpadní vody a biomasy (Zábranská et al., 2001), či nepřímo určováním rychlosti spotřeby kyslíku (respirace) potřebného pro oxidaci substrátu, respirační rychlosti se řadí do kategorie kinetických testů (Zábranská et al., 2001)

Respirace se týká aktivity směsi živých kultur mikroorganismů a odpadní vody (substrátu) a stanovení nároků biomasy na množství kyslíku rozpuštěného ve vodě. Respirace je vyjádřením biologické potřeby mikroorganismů pro jejich metabolismus, jehož pomocí dochází k degradaci kontaminantu. Výstupem měření respirace je určení aktivity mikroorganismů (Zábranská et al., 2001).

$$\text{Obecně je měřena objemová respirační rychlost } r_{V,H,\max} \doteq \frac{|\Delta c_{O_2}|}{|\Delta t|} \left[\frac{mg}{l \cdot hod} \right], \quad (18)$$

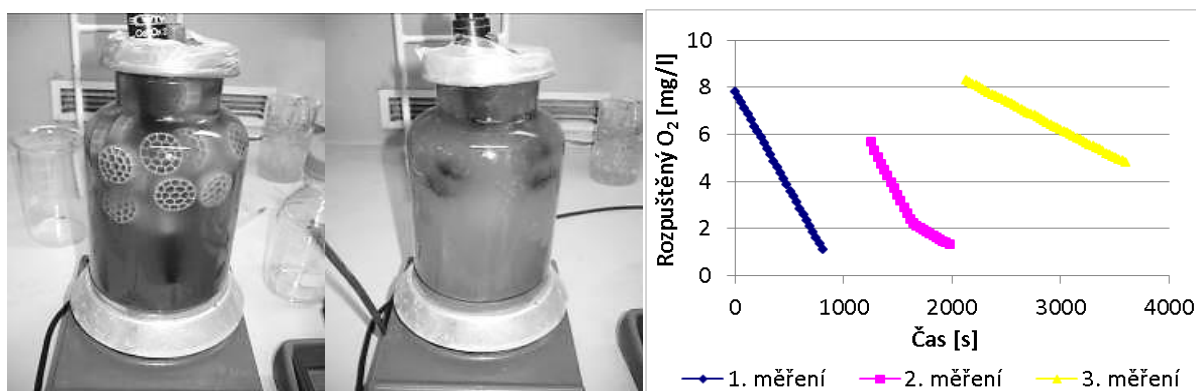
kteřá je vztažena na jednotku objemu směsi v reaktoru. Jedná se o podíl absolutních hodnot rozdílu koncentrace rozpuštěného kyslíku a rozdílu příslušných časů.

Pro různé biologické směsi můžeme získat stejné objemové rychlosti při různých koncentracích populace. Proto se častěji využívá specifické rychlosti, jedná se o vztaženou hodnotu objemové respirační rychlosti r_V k sušině biomasy X (Zábranská et al., 2001). Specifická respirační rychlost vyjadřuje aktivitu biomasy vztaženou na jednotkovou hmotnost biomasy, jejíž množství se může ve stejném objemu lišit.

$$\text{Specifická respirační rychlost je dána } r_{X,H,\max} = \frac{r_{V,H,\max}}{X} \left[\frac{M}{M \cdot T} \right] \left[\frac{mg}{g \cdot hod} \right] \left[\frac{g}{g \cdot den} \right] \quad (19)$$

Specifická respirační rychlost udává rychlost spotřeby kyslíku mikroorganismy v $[mg/(g \cdot hod)]$. Používá se ke stanovení minimální potřebné hodnoty okysličováním systému (udávané oxygenační kapacitou) pro metabolické procesy biomasy. Sušina biomasy X se nejčastěji stanovuje filtrací a vysušením (dle kapitoly 1.2.3 stanovení sušiny). Změřená hodnota sušiny kalu $X_{měř}$ se přepočtem vztáhne na jednotku objemu (Zábranská et al., 2001).

$$X = X_{měř} / V [mg / l] \quad (20)$$



Obrázek 31 – Respirometrická cela, komerční a nanovláčkové nosiče; Příklad průběhu respirace

Experimenty se nejlépe provádí v respirometrické cele, ve které je zabráněno volnému přístupu vzduchu k hladině biologické směsi. V průběhu kinetického testu se střídají periody měření spotřeby kyslíku s periodami provzdušňování. Na obrázku 31 jsou zobrazeny experimenty s komerčními nosiči

vlevo a s nanovláknými nosiči vpravo. Pro potřeby disertační práce byla respirometrická cela upravena, a to tak, aby pokryla potřeby měření respirace daných nosičů a suspenze.

Provzdušňování je prováděno ponorným aerátorem a směs je nasycena rozpuštěným kyslíkem na koncentraci okolo 8 mg/l. Prvním provzdušněním je do směsi přivedeno dostatečné množství kyslíku. Poté dojde k nadávkování substrátu (například fenolu) o koncentraci 2 mg/l. Cela se uzavře a utěsní. Spotřebováváný kyslík (klesající hodnoty rozpuštěného kyslíku v systému) je zaznamenáván měřicím přístrojem z kyslíkové sondy (připojené k WTW multimetru) vnořené do směsi a utěsněné v respirometrické cele. Když je koncentrace kyslíku blízká hodnotě 2 mg/l, následuje nová etapa aerace a celý cyklus je několikrát opakován, než dojde ke zlomu, který indikuje odstranění substrátu (viz příklad měření na obrázku 31). K zajištění homogenity směsné kultury mikroorganismů a kyslíku bylo zajištěno míchání za pomoci magnetického míchadla umístěného na dně respirometrické cely.

1.3. Nosiče biomasy

Pro laboratorní experimenty byly zvoleny dva typy nosičů – komerční polyetylenový nosič AnoxKaldnes (typ K3, specifikace dle kapitoly 1.7.3 dle teoretické části práce) jako nosiče pro fluidní lože; a nově vyvíjený nanovlákný nosič jako nosič ve fluidním či fixním loži (specifikace dle kapitoly 2.2.1 b, c).

V reálné praxi byly ověřeny jak různé nespecifické nosiče biomasy, tak zcela původní komerční zahraniční technologie (dle kapitoly 1.7.2 v teoretické části práce). Obecnému rozšíření těchto technologií však brání, přes jejich nesporné výhody, cena nosiče i celé dodávky technologie, stejně jako dostatečné reference. Cena hraje jistě významnou úlohu v případě běžných komunálních vod, kde se náklady pohybují v desítkách Kč/m³. V případě čištění specificky nebo extrémně znečištěných odpadních vod, kde jejich společné čištění na běžných komunálních ČOV není možné a kde náklady na jejich čištění jsou významně vyšší, je aplikace těchto technologií již přijatelná.

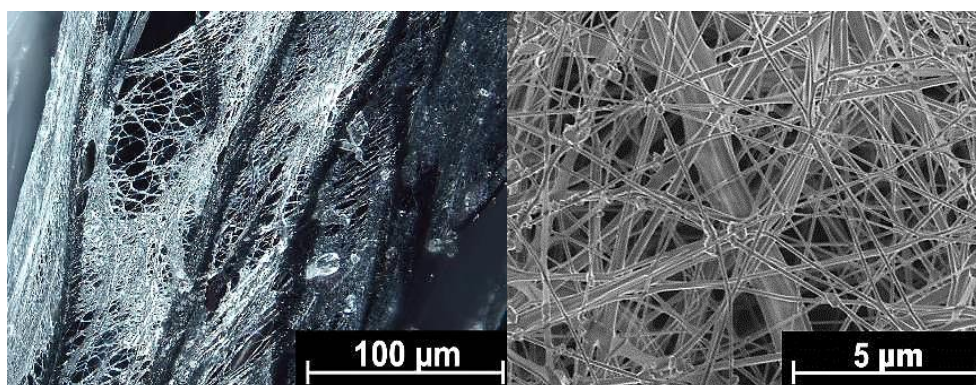
Pro zvýšení měrného povrchu nosiče a dosažení jeho optimální morfologie se právě zde nabízí nesporné výhody v použití pokrokových nanovlákných materiálů. Nanotechnologie je moderní vědní disciplína, která je mimo jiné schopna vytvářet ultra jemná vlákna (průměr se pohybuje v rozsahu do 1000 nm). Tato nanovlákna mají řadu významných vlastností, které je činí výbornými pomocníky v široké řadě aplikací (vysoce účinné filtry, separační nano-reaktivní membrány, podklad pro tkáňové inženýrství, uhlíkové nano-trubice, výztuhy pro kompozitní materiály, bimetalové nanokovové částičky a mnoho dalších biologických aplikací). Nanotechnologie se mimo jiné využívají při čištění odpadní vody ve formě nul-mocných nanočástic železa (nZVI), jako bioaktivní nanočástice (například stříbra) pro dezinfekci vody, kovy a kovové nanočástice oxidů (například TiO₂) a mnoho dalšího (Cloete 2010).

Výroba nanovláken

Na základě daných parametrů dle kapitoly 1.7.1. (teoretická část práce) byl před pěti lety na Technické univerzitě v Liberci (TUL) zahájen vývoj nového typu nosiče biomasy, který je založen na využití polymerních nanovlákných materiálů. Nanomateriály poskytují řadu výhod, především

velký měrný povrch a optimální morfologii povrchu. Základem nosičů jsou nanovláknenné vrstvy získané metodou electrospinning (Jirsák et al. 2005).

Nanovláknenné vrstvy jsou na nosné vlákno aplikovány v zařízení Nanospider™, což je unikátní patentovaná technologie zvlákňování z volné hladiny roztoku (nebo taveniny) polymeru v silném elektrostatickém poli bez použití trysek (Jirsák et al. 2005). Princip je známý ve své podstatě od roku 1910 (Zeleny 1914). Roztok je dávkovacím zařízením vytlačen z trysky, která je zároveň jednou z elektrod elektrostatického pole. Působením elektrostatického pole dochází k vytažení vláknenného útvaru směrem k opačné elektrodě a následnému rozštěpení na jemná vlákna (výrobnost technologie Nanospider™ se pohybuje mezi 1 až 5 g/min.m). Měrný povrch těchto vláken je natolik velký, že ještě před dopadem na opačnou elektrodu jsou vlákna vysušena (Jirsák et al. 2003; Jirsák et al. 2004; Růžicková 2004; Martinová et al. 2005; Militký 2007). Aplikace nanovláknenných vrstev na nosné vlákno probíhalo v laboratořích TUL, na fakultě textilní. (Jirsák et al., 2010)



Obrázek 32 – Detail nanovláknenné vrstvy ukotvené na vyvíjené niti pro různá měřítka

1.4. Reaktory

Předkládaná disertační práce se zabývá biologickým čištěním, které probíhá v laboratorních podmínkách, jedná se o systém s kombinovanou kontinuální kultivací biomasy ve směšovací reaktoru, bez recirkulace kalu, kde nosič biofilmu je umístěn do aktivací nádrže. Dle daného uspořádání je v práci používáno systému fixující biomasu na pevném nosiči, a to buď na pevně kotvené nosiče biomasy, nebo na nosiče biomasy ve formě tělísek vznášejících se v kapalině ve fluidním loži. V reaktoru se nachází biomasa dispergovaná (v suspenzi) i vázaná na nosiči (hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou).

Reaktor byl tvořen skleněnou válcovou kádinkou o objemu 5000 ml, kde reakční objem činil 3000 ml, reakční objem byl udržován umělým přepadem. Přítok a odtok reálné nebo modelové vody (specifikace dle kapitoly 1.1) byl realizován peristaltickým čerpadlem Watson Marlow. Doba zdržení odpadní vody je volena v závislosti na charakteru odpadní vody, na aktivitě mikrobiální populace a na efektivitě čistícího procesu, pro každý experiment je nastavován individuálně (pohybuje se v rozmezí cca. od 10 do 2 dnů).

Pro porovnání účinnosti vyvíjeného nanovláknenného nosiče byl paralelně provozován shodný reaktor avšak s komerčně dostupným nosičem AnoxKaldnes (dle kapitoly 1.7.3, nosič AnoxKaldnes typ K3). Pro každý typ nosiče byl použit samostatný reaktor, provozovány však byly za stejných podmínek

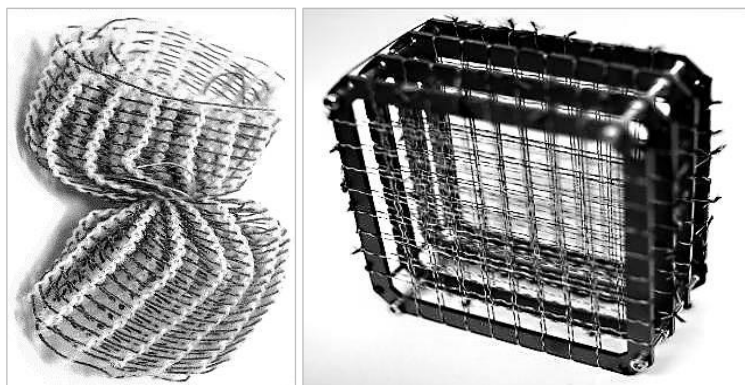
(průtok odpadní vody, typ mikroorganismů, teplota, salinita, aerace aj.), přesné nastavení je uvedeno u daných experimentů.

Mikroorganismus *Rhodococcus erythropolis* vyžaduje použití aerobních reaktorů, bylo zvoleno pneumatické vhánění vzduchu kompresorem. Turbulentní proudění je důležité pro zachování homogenní směsi v reaktorech, k udržení nosičů ve vznosu, k transportu substrátu (energie, tepla, kyslíku a živin) k biofilmu, k udržení tenké aktivní vrstvy biofilmu na nosiči a k oksylování vody. Aerátory umístěné na dně reaktorů zajišťují středně-bublinou aeraci a axiální proudění média.

Volně pohybující se nosiče jsou v reaktoru drženy pomocí odtokových sítí umístěných na výstupu reaktoru. Náplň fluidních nosičů v reaktoru činil 30 % sypného objemu reaktoru. Fixované nosiče jsou v reaktoru umístěny na pevném rámu o rozměrech 10 x 10 cm, s velikostí oka sítě cca 1 cm, rám byl do reaktoru vložen volně na záchytných provázcích, které jej měli za cíl udržet nad provzdušňovacím zařízením.



Obrázek 33 – Laboratorní sestavení experimentu (bioreaktor, čerpadlo, záchytná nádrž, aerátor)



Obrázek 34 – Příklad fluidního nosiče a mechanismus ukotvení do pevného rámu

1.5. Použité chemikálie a vybavení

1.5.1. Chemikálie

Chemikálie potřebné pro přípravu růstových medií, roztoků stopových prvků a pro přípravu média k hodnocení toxicity: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , KCl , NH_4Cl (Lachner). Chemikálie pro přípravu modelové vody: anilin, kyanidy, DPG, chloramin B, fenol, kresol (Lachner, Penta). Chemikálie a polymery potřebné pro přípravu nanovláknenných nosičů: polypropylen, polyuretan, polyetylen, kopolymerní lepidlo (etyl-vinil-acetát). Chemikálie a polymery potřebné pro hodnocení nanovláken či biofilmu: textilní barvivo Javana, chrom-sírová směs.

1.5.2. Pomůcky a přístrojové vybavení

Spektrofotometr DR-2800 Hach-Lange, sušárna Memmert GmbH, mikroskop Olympus BX51M, digitální jednooká zrcadlovka Olympus E-510, SW QuickPhoto Micro 2.3 s modulem Deep Focus 3.1., elektronový mikroskop Zeiss Evo MA Series, fluorescenční mikroskop Zeiss Axio Imager M2, snímací kamera Axio Cam MRm a fluorescenční lampa Colibri, příruční fotoaparát Canon EOS 350D s objektivem Sigma 30mm 1:1.4, provzdušňovací zařízení (aerátory Air Mac Air Pump), peristaltické čerpadlo Watson Marlow (Sci 323), WTW multimetr a sody (pH-elektroda Sen-Tix 41, sonda konduktivity Tetra Con 325, kyslíková sonda Stirr Ox. Filtrační systém Sterifil® (Aseptic Systém and Sterifil 47 mm filter Holder, objem 250 ml, Millipore), nitrocelulosové filtry SYNPOR®, Nr. 6 (Pragopor, ČR) o velikost pórů $0,4 \mu\text{m}$, pro filtraci médií: Cellulose acetate filter, velikost pórů $0,2 \mu\text{m}$ (Sartorius AG, Německo), vývěva olejová Lavat, automatické mikropipety Eppendorf, digitální analytické váhy Kern (KERN&Sohn), digitální předvážky Kern (KERN&Sohn), laboratorní sklo od Technosklo s.r.o. (Fisher Scientific, spol. s r.o.), horizontální třepačka Heidolph Instruments, míchací zařízení Vortex od Heidolph Instruments, PC Dell Precision T1600, Intel(R) Xeon(R), SPU E31270 @ 3.4 GHz, 16 GB paměti, 64 bit OS.

Použitý software pro získání a zpracování dat: Windows 7 SP1, Microsoft Office Standard 2010 (32bit verze, 14.0.6129.5000), Matlab R2009b (64bit Win, 7.9.0.529).

Fb. VÝSLEDKY A DISKUSE

Disertační práce byla řešena od července roku 2009 do června roku 2013 na pracovištích Technické univerzity v Liberci. Velice tímto děkuji ústavu Nových technologií a aplikované informatiky na Fakultě mechatroniky, informatiky a mezioborových studií (NTI); a také výzkumnému centru Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace (Cxi), v rámci jejichž pracovišť byla předkládaná práce řešena.

2. VÝVOJ NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE

Pro dekontaminaci znečištěných odpadních vod se stále hledají vhodnější materiály a postupy, které procesy biologické dekontaminace urychlí, zefektivní, případně i zlevní. Jednou z možných variant je využití stávající technologie nosičů biomasy v kombinaci s novými metodami nanotechnologie (nanovláknenných materiálů), na což je zaměřena předkládaná disertační práce. Cílem je vytvořit zcela speciální nosič biomasy pro čistírenské technologie založený na nanovláknenných resp. mikrovláknenných sítích.

Hlavním cílem předkládané disertační práce je vytvořit původní nosič biomasy disponující výhodami z oblasti nanotechnologie a maximálně podporující buněčnou kolonizaci. Rozvoj moderního a originálního přístupu nanovláknenného nosiče představuje parciální a paralelní řešení mikrobiologie, materiálového inženýrství a bioinženýrství. Výsledkem tak je výroba jemných polymerních vláken, s průměrem od desítek nanometrů po několik mikrometrů.

2.1. Nosič biomasy jako určující prvek při čištění odpadních vod

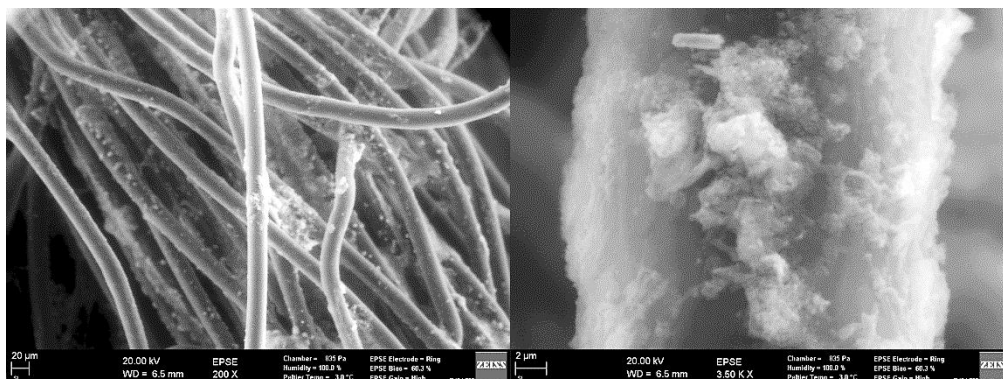
Na základě daných parametrů byl na Technické univerzitě v Liberci (TUL) zahájen vývoj nového typu nosiče, který je založen na využití nanovláknenných materiálů (viz kapitola 1.3). Výslednou formou aplikace je niť, která je tvořena nosným vláknem s nánosem nanotextilie, která je dále zformovaná do speciálních tvarů. Jednoznačnou výhodou těchto nosičů je vysoký specifický povrch (díky nanovláknenným vrstvám; poměr povrchu vlákna k jeho objemu je maximální).

Nanovláknenný nosič biomasy je určující prvek při aplikaci čištění odpadních vod, který splňuje požadované vlastnosti (dle kapitoly 1.7.4 v teoretické části práce) a dále díky své specifické morfologii má další významné výhody:

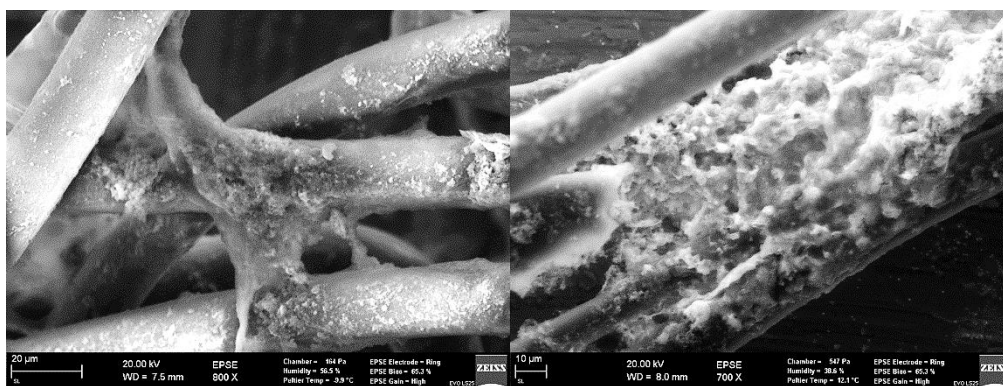
- 1) Materiály, z nichž jsou nanovláknena a základní nit vyrobeny, jsou polymery (polypropylen, polyuretan, polyetylen), kde tyto materiály jsou pro vodní organismy a pro mikroorganismy zcela netoxické a biokompatibilní.
- 2) Většina mikroorganismů lépe adhezuje na hydrofobní povrchy (plasty) než na hydrofilní (sklo), (Palmer et al., 2007). Využití polymerních nanovláken s sebou přináší vyšší afinitu mikroorganismů k jejich povrchu a tím snazší a rychlejší počáteční kolonizaci.

- 3) Použité materiály a jejich úprava je biochemicky inertní, chemicky stabilní a v závěru po vyhodnocení několika testů a provedení finálních úprav (v rámci předkládané disertační práce) bylo docíleno i fyzikální stability nanovláknenného nosiče (resp. nanovláknenných vrstev na nosiči).
- 4) Morfologická vhodnost nanovláknenného nosiče je zaručena využitím nanovláknenných struktur, které jsou umístěny na povrchu nosné nitě. Povrchová struktura, vysoký specifický povrch, velká mezerovitost a póry o velikosti nano-měřítko umožňují velice rychlé ulpívání a následně upoutávání mikroorganismů. Mikroorganismy kolonizují především povrch nanovláken, ale díky jejich charakteristické morfologii jsou schopny prorůst i do vnitřní struktury nitě, výsledná stabilita biofilmu je mnohonásobně vyšší oproti jiným nosičům. Navíc dle (Mulder and Heijnen 1988; Heijnen et al. 1992) drsnost povrchu nosiče zlepšuje rozvoj biofilmu. Drsnost povrchu je dominantním faktorem pro růst biofilmu, a to více než fyzikálně-chemické vlastnosti daného povrchu (Loosdrecht et al. 1988). Pokud mikroorganismy kolonizují nanovláknenné struktury jsou mnohem více chráněny před smykovým třením (což by jinak mělo za následek uvolňování biofilmu).
- 5) Jedinečný design nanovláknenného nosiče, extrémní flexibilita, poddajnost, tvarovatelnost (snadná formovatelnost, jelikož nosič není z „tvrdého“ polymeru o předem daném tvaru) a zároveň vysoká stabilita a navíc technologický způsob výroby (chaoticky propletená vlákna a nanovláknena a prostorové obloučky jednotlivých vláken) ještě více zvyšuje výsledný povrch nosiče (až desítky m^2/g).
- 6) Velkou výhodou nanovláknenného nosiče je možnost kombinovat dané polymery a tím nastavovat densitu nosiče (od hustoty cca. $900 \text{ kg}/\text{m}^3$ až po $1200 \text{ kg}/\text{m}^3$), v podstatě přímo dle specifické aplikace, dle požadavků dané odpadní vody nebo charakteru využívaných buněčných konsorcií. Měrná hmotnost nosiče může být vždy srovnatelná s odpadní vodou.
- 7) Možnost vytvářet zcela libovolný design nosiče (pro fluidní lože i pro fixní lože) umožňuje aplikaci tohoto typu nosiče pro zcela libovolný charakter odpadní vody, bakteriální populace nebo dle specifických požadavků čištění odpadních vod. Například pro pomalu rostoucí mikroorganismy je možné využít textilní pleteniny s menší vzdáleností nití (tzv. rozestup ok síta), pro rychle rostoucí mikroorganismy lze využít textilní síť s hustším proplétáním.
- 8) Významnou výhodou nanovláknenného nosiče je možnost narůstání bakteriálního biofilmu nejen na povrchu nosiče, ale také blíže k jeho středu (uvnitř nosiče, resp. uvnitř vlákna, jak dokazují níže uvedené fotografie), kde jsou bakterie lépe chráněny před toxickými vlivy okolního prostředí (např. střížné síly hydraulického míchání). Vyšší ochranu buněk zajišťuje samozřejmě i extracelulární biomasa. Díky struktuře podkladové a nanovláknenné nitě je umožněno pronikání substrátu a kyslíku k mikroorganismům i pro mocnější biofilmy.
- 9) Tloušťka biofilmu je rozhodujícím parametrem, jen vrstva penetrována kyslíkem (aktivní biofilm) se zúčastňuje degradačních procesů. Tloušťka aktivního biofilmu se obvykle pohybuje v rozmezí 50 až $150 \text{ }\mu\text{m}$ (Chudoba 1991). Díky využití nanovláknenných vrstev a díky možnosti pronikání kyslíku a živin ze spodní strany biofilmu (ze strany od nosiče) je možné, že mohutnost aktivního biofilmu může být pro tyto struktury až dvojnásobná, tj. 100 až $300 \text{ }\mu\text{m}$, což by pro remediační aplikace (například čištění vysoce zatížených průmyslových odpadních vod) mohlo být velkým přínosem.

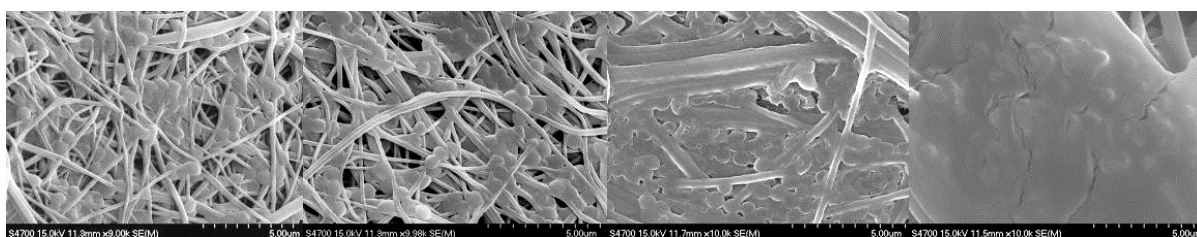
- 10) Finanční náročnost současných typů nanovláknenných nosičů je sice mírně vyšší než je tomu u komerčních nosičů. Avšak v průběhu času, až se způsob výroby nanovláknenných nosičů více rozšíří, pak klesne současná cena a nové nanovláknenné nosiče budou moci cenově konkurovat stávajícím komerčním nosičům.



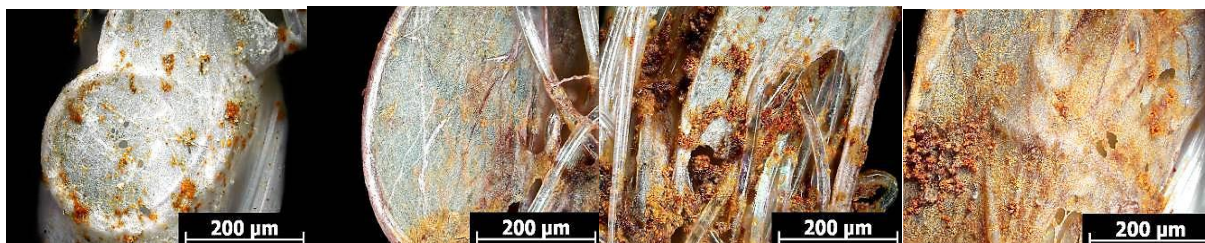
Obrázek 35 – Dokumentace kolonizovaného nosiče (20 hodin kultivace). Detail nosiče porůstajícího biofilmem a zachycení prvních solných inkrust (pořízeno na pracovišti Zeiss, Německo)



Obrázek 36 – Dokumentace kolonizovaného nosiče (pořízeno na pracovišti Zeiss, Německo)



Obrázek 37 – Dokumentace vývoje kolonizace nanovláknenného nosiče pomocí elektronového mikroskopu (140, 160, 210 a 330 hodin). Dokumentace narůstání bakteriálního biofilmu na/v nanovláknenných vrstvách (resp. uvnitř nosiče). (pořízeno na VŠCHT Praha)



Obrázek 38 – Fotografická dokumentace vývoje biofilmu na nanovláknenném nosičích (1, 5, 10, 15 den). Po delší době kolonizace se mikrobiální biomasa přirozeně rozroste i na místa bez nanovláken.

Kapitola „Nosič biomasy jako určující prvek při čištění odpadních vod“ shrnuje základní poznatky výroby nanovláken a charakterizuje jejich výjimečné vlastnosti jako nosičů bakteriální populace.

Výroba nanovláken a jejich aplikace byla metodicky provedena v návaznosti na konzultace s fakultou textilní. Za mnoho praktických námětů patří velký dík prof. RNDr. Oldřichu Jirsákovi, CSc. a Filipu Sanetrníkovi. V rámci vlastních zdrojů fakulty jsme nebyli schopni zajistit výrobu nanovláknenných struktur samostatně, proto výrobu těchto vláken zajišťoval pan Filip Sanetrník z Katedry netkaných textilií a nanovláknenných materiálů.

Za fotografickou dokumentaci nosičů děkuji prof. RNDr. Vladimíru Jirků, DrSc. z Ústavu biotechnologie, Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, který poskytl fotografie zachycující vývoj kolonizace nanovláknenného nosiče (na/v nanovláknenných vrstvách) pomocí elektronového mikroskopu (140, 160, 210 a 330 hodin). Fotografie dokumentující kolonizovaný nosič a jeho detail včetně zachycení prvních solných inkrust byly pořízeny elektronovým mikroskopem značky Zeiss při zkušebním snímání na pracovišti Zeiss, Německo. Všechna ostatní fotodokumentace byla nasnímana v rámci disertační práce v laboratořích NTI a CxI pomocí mikroskopu Olympus BX51M (detaily v kapitole 1.2.4).

2.2. Charakterizace nanovláknenného nosiče

Nanovláknna a z nich připravené nanotextilie představují prudce se rozvíjející odvětví materiálového průmyslu. Tyto kompozitní materiály mají velký aktivní povrch při nízké specifické hmotnosti a jsou velmi vhodné pro přípravu modifikovaných nosičů přirozených biofilmů cíleně připravených pro specificky znečištěné odpadní vody, ale i pro intenzifikaci klasických čistírenských technologií. Konstrukce nosičů biomasy je zcela zásadní pro dosažení maximální účinnosti čistírenských procesů, přičemž kromě speciálního tvaru jsou důležité materiálové a strukturní charakteristiky nosičů.

2.2.1 Historie vývoje nanovláknenných nosičů

Vývoji nanovláknenných nosičů předchází historie vývoje nanovláknenné nitě, z nichž jsou nosiče vytvářeny.

a) Vývoj nanovláknenné nitě jako nosiče biofilmu

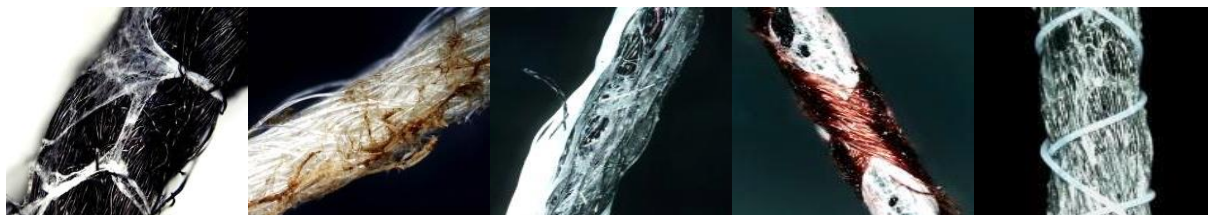
Nejprve byla nosnou nití bavlna (na *obrázku 39* níže, vzorek A), která ovšem vykazovala vysokou míru nasákavosti, měrné hmotnosti, sorpce a také byla velice tvarově nestabilní. Nanovláknna na této niti byla nanosena ještě velice nerovnoměrně (díky malým zkušenostem při výrobě). Současně bylo nutné pro nanovláknennou vrstvu selektovat vhodný materiál. Hlavním cílem bylo, aby materiál mohl být zvláknován a současně aby byl vhodný pro aplikace při biologickém čištění odpadních vod. V návaznosti na spolupráci s fakultou textilní přicházeli na výběr tyto materiály: polyethersulfon, polyvinyl butyral, polyuretan. Na základě laboratorních hodnocení (dle kapitol uvedených níže)

splňoval polyuretan i další náležitosti, jako mechanická a chemická stálost, pružnost, nízká opotřebovatelnost a dotyková odolnost.

Následně byla nosnou nití polyesterová vlákna, která již byla nenasákavá a vcelku stabilní (obrázek 39, vzorek B). Výsledná niť již dosahovala vcelku přijatelných vlastností (lepší rovnoměrnost pokryvu nanovláknem). Problém však nastával v okamžiku aplikace nosičů, kdy povrch ještě nebyl dostatečně kolonizován organismy, tehdy se nanovláknem uvolňovala z povrchu nosiče nebo docházelo k jejich shlukování (jak je uvedeno na fotodokumentaci, dle obrázku 39 níže, vzorek B). Z těchto důvodů byl na základě výsledků předkládané disertační práce navržen přístup za využití fixace nanovláknenné vrstvy přidavnou ochrannou nití.

Přistoupilo se k další variantě (obrázek 39, vzorek C), kde nosnou a krycí nití byla polyesterová vlákna (pokryv tvořila polyuretanová nanovláknem). Podkladová vlákna bylo možné produkovat s černým či bílým zbarvením. Díky černé niti bylo možné pozorovat stabilitu nanovláken (využívalo se barevného kontrastu bílých nanovláken na černém podkladu), díky bílému podkladu pak byla pozorována kolonizace mikroorganismy (využívalo se barevného kontrastu hnědého biofilmu na bílých nanovlákních a bílé podložní niti).

Poslední vzorek byl dále zdokonalován a výsledkem byl vzorek D (obrázek 39), kde základní vlákno je polypropylen, nanovláknem tvoří polyuretan a fixace je vytvořena z polyetylenových vláken. Povrchová fixace byla daleko více propracovaná (pevněji ovinuje nanovrstvy) a nanovláknem jsou stabilizovány mnohem účinněji. Ovšem díky tlusté fixační niti došlo k velké redukci měrného povrchu, z důvodu zakrytí nanovláknenných vrstev.



Obrázek 39 – Přehled vývoje nanovláknenné nitě (vzorek A – E)

Nanovláknenná příze je finálně složena ze tří částí (obrázek 39, vzorek E). Základní vlákno je polypropylen Prolenvir CE (660 dtex, tvarovaný vzduchem), povlak se skládá z polyuretanových nanovláken Larithane 1083 (dle využívaného způsobu výroby bylo možné rozpětí 30 – 100 dtex, metoda electrospinning, průměr nanovláken je cca. 260 nm), vše je dvojité obtočeno ochranným polyetylenovým vláknem (167 dtex, chrání vůči tření při zpracování a při následných aplikacích proti dezintegraci nanovláken). Osnova pro plošné útvary je tvořena polypropylenovým vláknem (200 dtex).

Na základě výsledků z kapitol níže (výběr materiálu pro nanovláknenné vrstvy, stanovení ideálního množství nanovláknenné vrstvy, testy sorpce látek na nanovláknenný nosič, testy dezintegrace) byla zvolena nanovláknenná niť typu polyuretan, nános 50 dtex. Tento vzorek prokázal nejvyšší rychlost kolonizace bakteriální populací a současně je velice vhodný díky „malé“ míře sorpce k povrchu a díky dostatečné stabilitě nanovrstev (nezbytností je přítomnost fixační nitě). Současně je polyuretan dobře zpracováván a produkován metodou electrospinning.

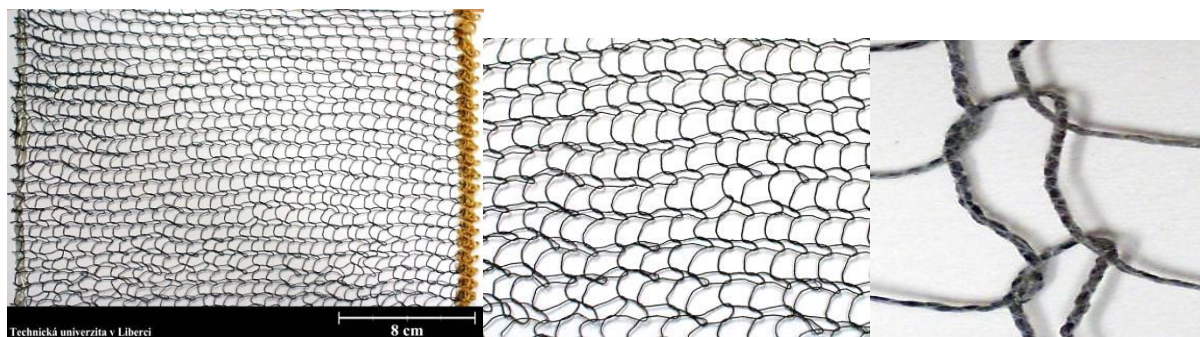
Specifický povrch výsledného útvaru s polyuretanovými nanovláknem s hodnotou 50 dtex má pro daný návrh konstrukčního řešení pro fixní lože až tisíce m^2/m^3 (hodnoty jsou důsledkem dlouhodobých testování, jejichž popis je uveden v kapitolách níže). Výslednou přízi je možno zpracovávat textilními

postupy do formy sférických smotků (pro použití ve fluidním loži) nebo do formy plošných útvarů (technologie proplétání s vloženým útkem, pro použití ve fixním loži).

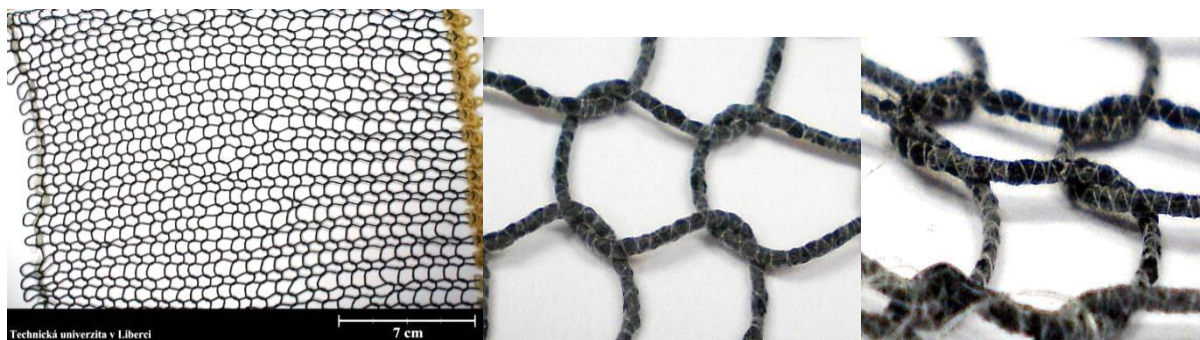
b) Návrh a vývoj fixních nosičů

Z patentové rešerše na celosvětový stav techniky textilních nosičů biomasy pro čištění odpadních vod, se zaměřením na pleteninové textilie plošného a chomáčového typu (uvedeno v kapitole 1.7.4 v teoretické části práce; Komberec, 2011) bylo vybráno několik příkladů a s jejich inspirací bylo vytvořeno několik následujících exemplářů fixních a fluidních nosičů.

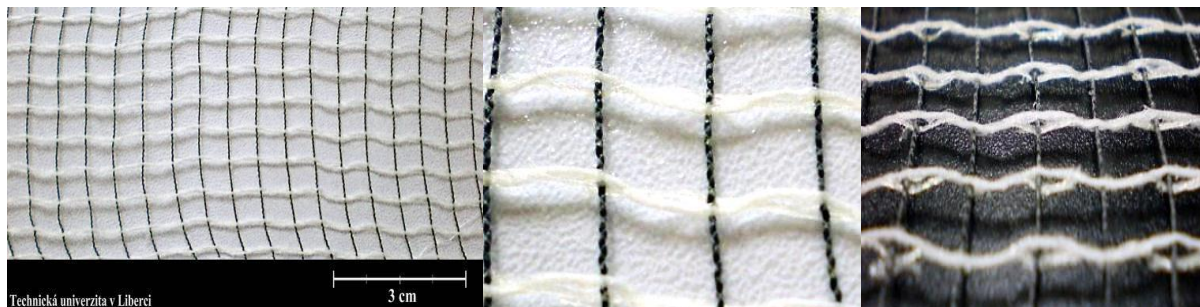
Z finálně uskupeného vlákna (obrázek 39, vzorek E) bylo vytvořeno několik 2D forem (tkanin, resp. pletenin). Z nitě je možné vytvořit například následující formace: tkanina (perlinková vazba), pletenina (zátažná), pletenina (osnova s vloženým útkem), příklady jsou uvedeny níže. (Jirsák et al., 2010)



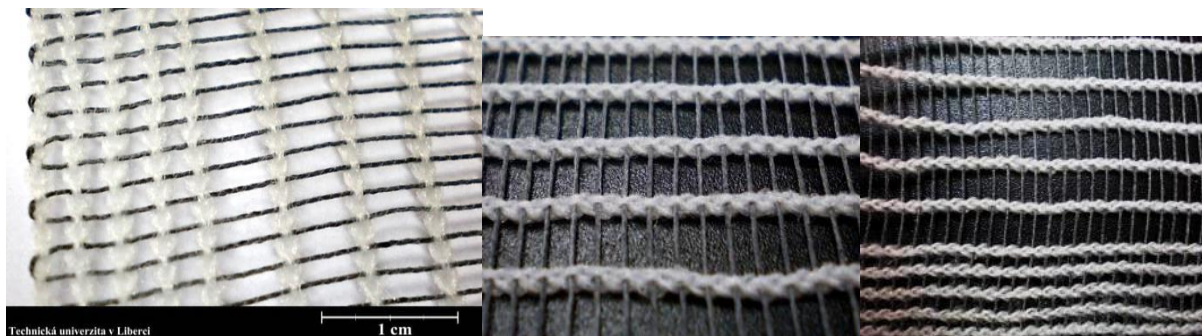
Obrázek 40 – Fixní nosič – Zátažná pletenina, nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)



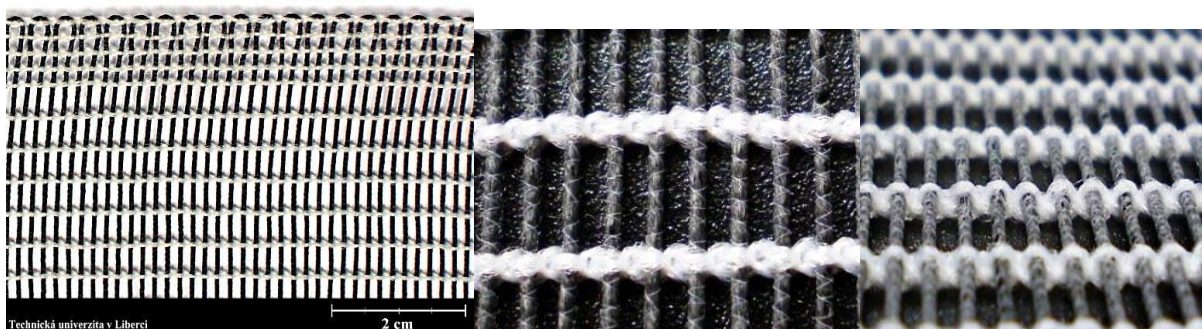
Obrázek 41 – Fixní nosič – Zátažná pletenina, 4x skaná nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)



Obrázek 42 – Fixní nosič – Tkanina, perlinková vazba, nit s nánosem pojiva, nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)



Obrázek 43 – Fixní nosič – Pletenina, osnova s vloženým útkem, řetízek PE, nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)

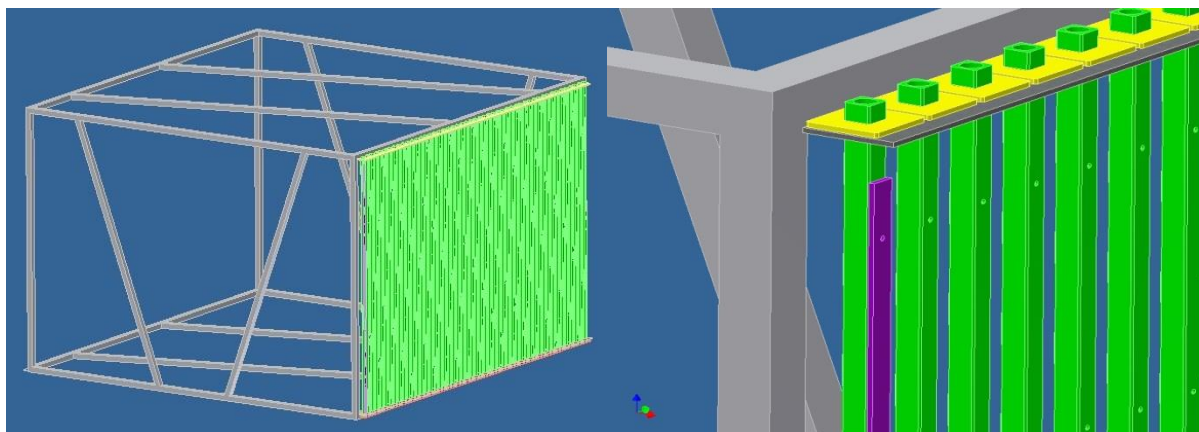


Obrázek 44 – Fixní nosič – Pletenina, osnova s vloženým útkem, řetízek PE, 4x skaná nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)

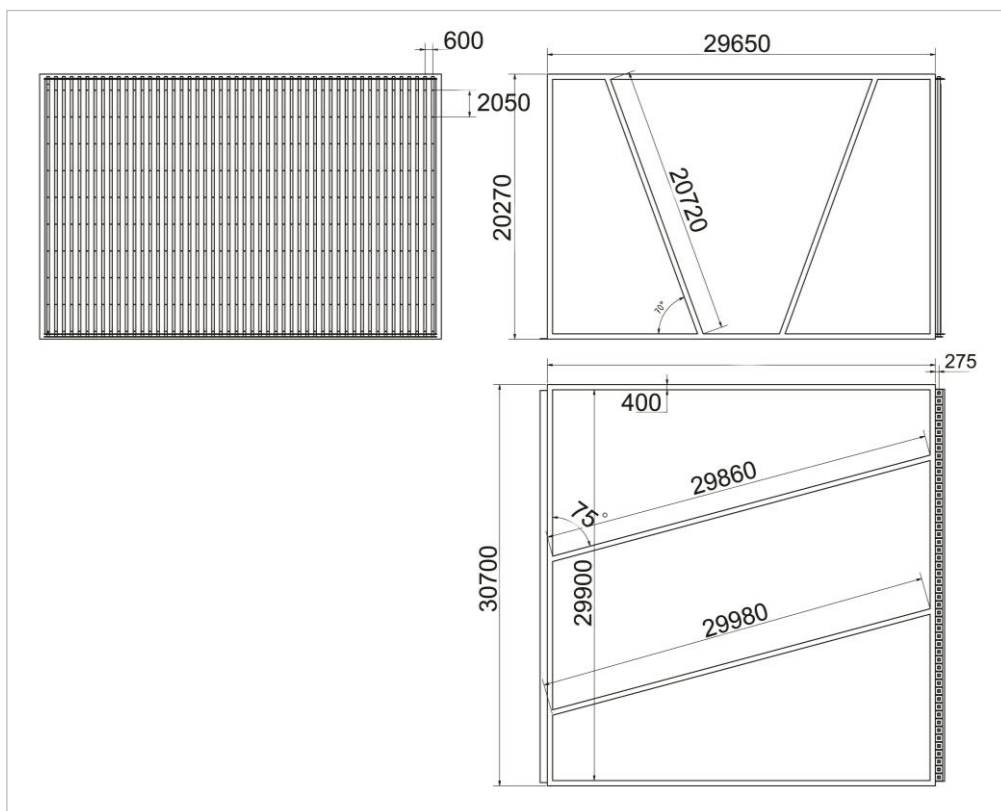
Pro laboratorní a reálné aplikace se uvažuje pouze o posledních dvou variantách fixního nosiče, které jsou uvedené na *obrázku 43* a *obrázku 44*. Tyto typy pleteniny splňují jak požadavky na jednoduchost a rychlost výroby, tak i požadavky na stabilitu nosiče. Cílem bylo tuto formu pleteniny do nádrže instalovat pevně, aby se aktivační směs pohybovala skrze nosič (forma fixované pleteniny).

Možností pleteniny je vysoká variabilita velikosti ok sítě, a to dle požadavků ČOV resp. dle charakteru odpadní vody a použité mikrobiální populace (např. v závislosti na rychlosti růstu mikroorganismů); pro komunální odpadní vody se předpokládá využití okatosti sítě například od velikosti 1 cm (aby nedocházelo k rychlému zarůstání nosiče), pro průmyslové vody je možná velikost ok již od 3 mm (vyšší aktivní povrch umožní docílit rychlé akumulace mikroorganismů).

Pro fixní nosič byl vyvíjen způsob ukotvení do nosných rámců. Technologie nosných rámců je způsob využití vyjímatelného modulu, který lze instalovat do nových i stávajících aktivačních nádrží. Díky specifické konstrukci lze manipulovat celým modulem najednou, případně jej lze sestavit na místě aplikace. Modul je vyroben z nerezového materiálu, který je odolný extrémním podmínkám bioreaktoru. Stávající konstrukci modulu (rozměry, tvar, aj.) lze upravovat dle specifických požadavků čistírny. Modul tvoří několik rámců umístěných paralelně vedle sebe (vzdálenost rámců lze nastavovat, minimální vzdálenost je pro současnou konstrukci 6 cm; počet rámců je obecně libovolný, maximální počet je pro současnou konstrukci 50 rámců). V každém nosném rámu je umístěna textilní pletenina, která je pevně uchycena do bočních krajů rámu. Každý rám je vybaven utahovacím mechanismem, který umožňuje dotažení případných provizů pleteniny (provisy mohou vznikat mechanickým namáháním a přirozeným stárnutím textilie). Modul lze umístit na podstavu, což umožní instalaci či zachování stávající aerační techniky pod tímto modulem.



Obrázek 45 – 3D simulace návrhu technologie vyjímatelných nosných ráků (Lederer, 2011)



Obrázek 46 – Náčes technologie vyjímatelných nosných ráků (nárys, bokorys, půdorys, Lederer, 2011)

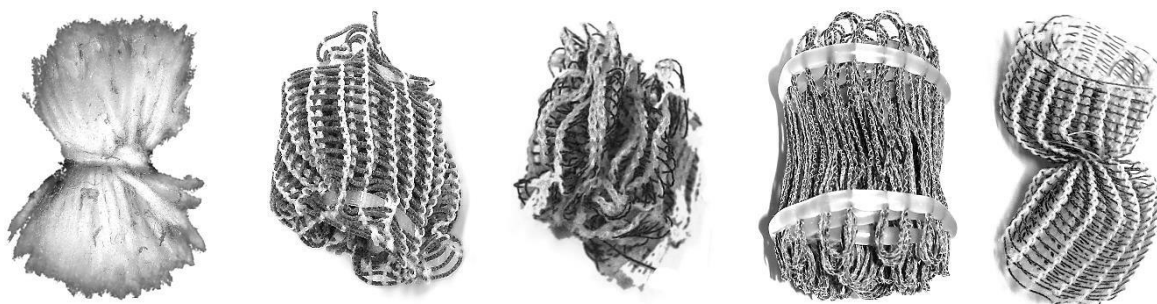


Obrázek 47 – Reálná konstrukce technologie vyjímatelných ráků (Lederer, 2011)

c) Návrh a vývoj fluidních nosičů

Druhá forma reaktoru je fluidní lože, kde nosič proudí spolu s aktivační směsí. Ve vývoji fluidního nosiče se sledoval především tvar, uskupení, velikost a stabilita nosiče, vznášivost nosiče ve vodě a další. Tvar nosiče může být obecně zcela libovolný, optimální je však sférická forma, což minimalizuje náklady na míchání. Do dnešního dne bylo odzkoušeno několik podob nosiče „bambule, soudky, mašličky“ (obrázek 48 níže). Tyto nosiče jsou pro reálné aplikace na čistírnách odpadních vod vcelku přijatelné, jen pro některé typy dochází k nežádoucím efektům.

Optimálním aeračním systémem pro fluidní nanovláknový nosič je středo-bublinná aerace, a to vzhledem k nutné vyšší mechanické energii na míchání těchto nosičů. Jiná je situace u potenciální intenzifikace stávajících čistíren, kde se v dnešní době nacházejí spíše jemno-bublinné aerátory. Pro tyto případy byl vyvinut nosič ve formě textilní pleteniny (vzájemně propletené jednotlivé nitě, viz předchozí kapitola).



Obrázek 48 – Příklad fluidních nosičů („bambule, tři typy „soudky“, „mašličky“)

Při vývoji byla zachována rozměrová srovnatelnost nanovláknových nosičů s komerčně dostupnými nosiči biomasy. Delší strana nosiče je cca 3 cm, délka nitě použitá na jeden nosič byla v průměru 5 m. Nosiče byly vytvořeny na základě vlastních návrhů, které částečně vzešly z rešerše na celosvětový stav techniky a patentovou čistotu textilních nosičů biomasy (část rešerše je uvedena v kapitole 1.7.4). Pro všechny typy nosičů byla použita nit, která byla specifikována v předchozí kapitole 2.2.1 a, obrázek 39, vzorek E.

Byly navrženy, vytvořeny a otestovány celkem tři formy fluidních nosičů – soudkovité, uzlíkovité a kónické. Navrženo, vytvořeno a otestováno bylo více jak 10 typů nosičů. Všechny navrhované nosiče byly máčeny v reaktoru po dobu jednoho měsíce, a to z důvodu selekce takových nosičů, které budou vhodné pro pozdější reálné laboratorní testy. Díky tvarové stálosti, malé tendenci se rozplétat a neshlukovat se k sobě navzájem a díky schopnosti udržení se ve vznosu byly nakonec vybrány tři druhy pleteninových nosičů (viz obrázek 49 níže), které byly reálně ověřeny (viz kapitola 3.1.).



Obrázek 49 – Nosiče zvolené pro laboratorní testování účinnosti čištění odpadních vod

Tělo nosiče tvoří textilie (dva typy pleteniny, specifikováno v kapitole 2.2.1 b, obrázek 43 a obrázek 44) dle následujících variant:

- I. Pletenina, osnova s vloženým útkem, osnova je řetízek PE, útek je nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)
- II. Pletenina, osnova s vloženým útkem, osnova je řetízek PE, útek je 4x skaná nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva. (Jirsák et al., 2010)
- III. Forma samotné nitě (kapitola 2.2.1, obrázek 39, vzorek E) je tvořena základním vláknem polypropylen, povlak se skládá z polyuretanových nanovláken a vše je dvojitě obtočeno ochranným polyetylenovým vláknem. Výsledná nit je natažena do mříže a na okrajích spojena kopolymerním lepidlem (etylvinilacetát). Konečná obdélníková struktura je stočena do tvaru soudku a opět fixována kopolymerním lepidlem. (Jirsák et al., 2010)

1. Fluidní soudkovité nosiče

Prvním testovaným nosičem byl fluidní nosič biomasy, který měl válcový tvar a byl tvořen sítí pevných vláken. Finálně byly vytvořeny tři typy těchto soudkovitých nosičů. Velikost všech variant je srovnatelná s komerčními nosiči a dosahuje cca. 3 – 4 cm (obecně je možné velikost variabilně nastavovat dle specifikací ČOV). Pletenina (varianta I. nebo II.) je stočena do tvaru soudku (dutého nosiče) a pevně spoutána okrajovými vlákny, která mají vyšší mechanickou pevnost a slouží k udržení pleteniny v daném tvaru. Fixace nosiče byla prováděna pravidelným propletením okrajových vláken mezi osnovami nití pleteniny. Vyzkoušeno bylo propletení v obou možných směrech (rovnoběžně a kolmo k útku). Vyrobeno bylo několik variací tohoto typu (viz následující tabulka 3) a to ze dvou různých pletenin (tenčí nosná nit, varianta I.; tlustší nosná nit, varianta II.) s různou délkou a šířkou výchozího pruhu pleteniny. Ve variantě III. byly jednotlivé nitě spojeny tavným pevným a pružným kopolymerním lepidlem (etylvinilacetát).

Tabulka 3 – Přehled vyrobených „prototypů“ soudkových nosičů a jejich vlastnosti.

Typ	Rozměry pásu	Popis	Vlastnosti
I.	3.5 x 9.5 cm	propleteno kolmo k útku	neplave, klesá ke dnu, nedrží tvar, částečně se rozplétá
I.	3.5 x 9.5 cm	propleteno rovnoběžně s útkem	plave nečinně na hladině, rozplétá se, nedrží tvar
I.	3.5 x 19 cm	propleteno kolmo k útku	vznáší se, drží tvar, občasné rozplétání krajní nitě
II.	3.5 x 9.5 cm	propleteno kolmo k útku	1/2 nosičů se vznáší, 1/2 klesá, drží tvar, rozplétá se
II.	3.5 x 19 cm	přepůleno podélným ohnutím a propleteno kolmo	vznáší se, plave na hladině, skvěle drží tvar, nerozplétá se
III.	10 m	spojení nití kopolymerním lepidlem	vzdání se, drží tvar, nedochází k rozplétání

Pro další testování byly selektovány nosiče, které jsou v *tabulce 3* výše orámovány tlustší linkou, tyto jsou uvedeny na obrázku níže.



Obrázek 50 – Návrhy soudkovitých typů nosiče (varianta I., varianta II. a varianta III.)

2. Fluidní nosiče ve formě uzlíků

Tělo nosiče je tvořeno nití (specifikace dle *kapitoly 2.2.1 a, obrázek 39, vzorek E*), která byla přetvářena do tzv. vodní trávy či obecně do uzlíkových útvarů (inspirováno dle patentové rešerše dle Komberec, 2011), délka nitě byla zhruba 5 cm. Jelikož smočená nit měla poměrně velkou hustotu, byla zde snaha zaujmout uzlíkem maximální plochu při malé tloušťce, aby se mohl nosič vznášet. I přes to se uzlíky ukázaly jako nevhodné, jelikož měli velkou tendenci se potápět.



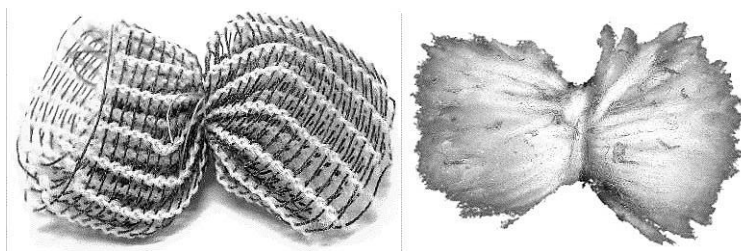
Obrázek 51 – Návrh uzlíkových typů nosiče

3. Fluidní kónické nosiče

Pro kónické útvary byla využita pletenina varianty *I. a III.* Nejprve byla z pleteniny navržena pyramida, která byla v podstatě obměnou soudků. Zafixováním spodní strany nosiče však vzniklo nerovnovážné rozložení hmotnosti a pyramidy se v reaktoru špatně vznášely. Proto byly spojeny dvě pyramidy k sobě a vytvořen byl útvar připomínající mašli. Tvaru mašle bylo dosaženo srolováním pásu pleteniny do válce a jeho následným stažením uprostřed. Velikost této varianty dosahuje cca. 4 cm (obecně je možné velikost variabilně nastavit).

Paralelní variantou mašlíček jsou bambule, což jsou jednotlivá samostatná vlákna vprostřed pevně stažena. Při aplikaci nosiče tvaru bambule však na koncích jednotlivých vláken (na okraji nosiče) došlo často k roztřepení nitě. Poté při aplikaci nosičů do reaktoru docházelo ke „slepování“ nosičů k sobě navzájem, mobilita jednotlivých nosičů v reaktoru byla velice omezena, či dokonce znemožněna. Velikost této varianty dosahuje cca. 3 – 4 cm (obecně je možné velikost variabilně nastavovat). Navíc u nosiče typu bambule může časem docházet k zarůstání nosiče ve středu nosiče a roztřepení konců vláken a tím porušení stability nanovrstev i samotných nití, čehož důsledkem je shlukování nosičů k sobě navzájem a narušení mobility fluidních nosičů v reaktoru.

Výhodou kónických typů nosičů je jejich možné využití pro reaktory se smíšenou populací (aerobní a anaerobní), a to právě díky vhodným anaerobním podmínkám ve středu nosiče (v místě stažení) a díky vhodným aerobním podmínkám na krajích nosiče.



Obrázek 52 – Návrh kónických typů nosiče (varianta mašlička, varianta bambule)

Kapitola „*Historie vývoje nanovláknenných nosičů*“ shrnuje základní poznatky z vývoje nanovláknenné nitě a z vývoje fixních a fluidních nosičů. Výsledky kapitoly „*Vývoj nanovláknenné nitě*“ byly založeny především na konzultaci s prof. RNDr. Oldřichem Jirsákem, CSc. a na konzultaci se školitelem práce Ing. Tomášem Ledererem, Ph.D. Postup ve vývoji nanovláknenné nitě jako například selekce vhodného materiálu, vhodného povrstvení nanovláknny nebo návrh použití fixačního vlákna byl vyhodnocen na základě výsledků disertační práce (uvedeno v následujících kapitolách). Výsledkem kapitoly je několik návrhů nitě s nanovláknenným pokryvem, z nichž finální návrh za použití polyuretanových nanovláken a fixační nitě je pro praktické aplikace nejvhodnější.

Výsledky kapitoly „*Návrh a vývoj fixních nosičů*“ byly založeny především na konzultaci se školitelem práce Ing. Tomášem Ledererem, Ph.D. Plošná 2D forma (tkanina, resp. pletenina) byla vytvořena na základě specifických požadavků. Poděkování za vytvoření 2D formy tkaniny patří fakultě textilní, především Filipu Sanetrníkovi a Ing. Michalu Komárkovi, Ph.D. Hlavním výsledkem práce bylo vytvoření 2D plošných struktur (pletenin), kterou je možné textilními postupy zpracovávat v různorodých variantách (různá velikost ok sítě, různá tloušťka základní nitě aj.)

Technologie využití nosných rámců, kterou je možné jako vyjímatelné moduly instalovat do stávajících i nových aktivačních nádrží byla zkonstruována na základě praktických zkušeností vedoucího práce Ing. Tomáše Lederera, Ph.D. Reálné sestavení této technologie, stejně tak jako její uvedení do provozu na ČOV Bochemie a.s. Bohumín, provedl Ing. Tomáš Pluhař a Ing. Jaroslav Nosek, Ph.D.

Výsledky kapitoly „*Návrh a vývoj fluidních nosičů*“ byly založeny především na základě vlastních návrhů, které částečně vzešly z rešerše na celosvětový stav techniky a patentovou čistotu textilních nosičů biomasy (část rešerše je uvedena v kapitole 1.7.4). Výsledky praktického hodnocení nosičů byly založeny na základě společného měření se studentkou Dominikou Kortusovou, na základě čehož vzešel společný článek:

KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., DUB, T., KORTUSOVÁ D., LEDERER T.: *Vývoj alternativních nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod*. Vodní hospodářství 2013, 63 (5), 151–155. (recenzovaný časopis).

Hlavním výsledkem práce bylo vytvoření několika typů fluidních nosičů (soudkovité, mašličkovité, případně bambule), které jsou reálně uplatnitelné pro ČOV.

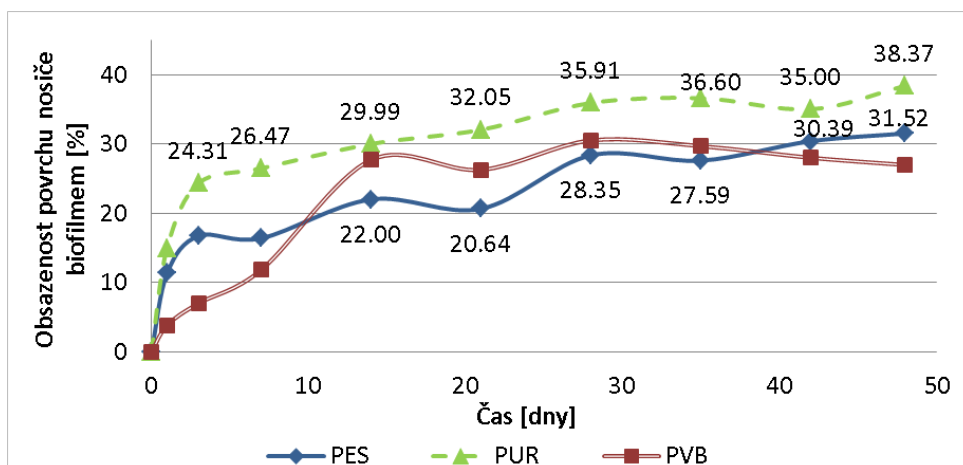
2.2.2 Výběr materiálu pro nanovláknenné vrstvy

Jak bylo uvedeno v kapitole 1.7.1 (teoretické části práce), materiál musí splňovat základní vlastnosti (biochemicky inertní, chemicky a fyzikálně stabilní, biokompatibilní a další). V rámci testů hodnocení vhodnosti polymerních materiálů se zde skýtal značný prostor k selekci nejvhodnějšího materiálu. V návaznosti na spolupráci s fakultou textilní přicházelo na výběr mnoho materiálů. Důležitým faktorem bylo, aby materiál mohl být zvlákňován a současně aby byl vhodný pro aplikace při biologickém čištění odpadních vod (tj. například aby nedocházelo k degradaci nosiče a polymer nebyl toxický). Na základě hraničních parametrů byly zvoleny tři typy materiálů: polyethersulfon, polyvinyl butyral a polyuretan.

a) Výběr materiálu na základě kolonizovatelnosti povrchu

Hlavním cílem testů kolonizace nanovláknenných vrstev bylo vysledovat, jaký vliv má použitý materiál (typ polymeru) na možnosti a schopnosti kolonizace mikroorganismy, resp. na míru adhesivity buněk k povrchu, a to především v úvodní fázi kolonizace, neboť ta má charakteristický dopad na finální strukturu biofilmu. Na základě laboratorního hodnocení (viz další laboratorní testy níže) splňoval polyuretan i další náležitosti, které musí nosič biomasy splňovat, jako mechanická a chemická stálost, pružnost, neopotřebovatelnost a dotyková odolnost.

Pro testování kolonizovatelnosti povrchu byla použita modelová voda s obsahem fenolu jako dominantního C-zdroje (specifikace v kapitole 1.1.3 b, o koncentraci 500 mg/l). Nanovláknenná nit (specifikace v kapitole 2.2.1 a, dle obrázku 39, vzorek C – kde podkladová nit byla bílá, aby bylo možné sledování kinetiky růstu mikroorganismů) byla umístěna do reaktoru (specifikace dle kapitoly 1.4). Hodnocení kinetiky růstu biofilmu probíhalo dle vyvinutého algoritmu (popis metody následuje (kapitola 4).

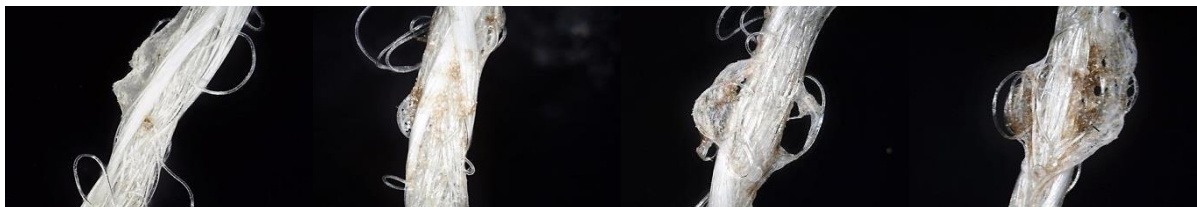


Obrázek 53 – Časový vývoj růstu biofilmu na různých typech nano-vláken (různé materiály polymeru)

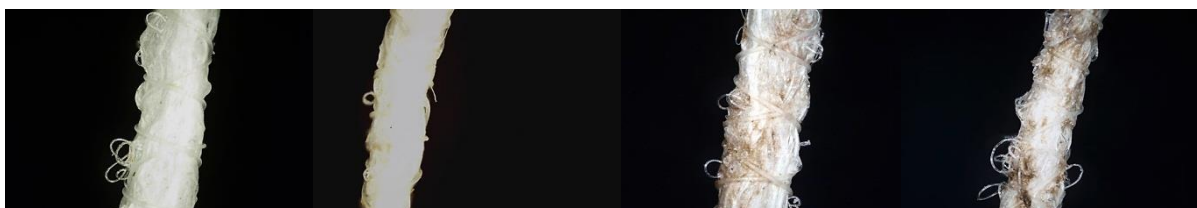
Výsledkem experimentů bylo zjištění, že polyuretan je pro nanovláknenné nosiče nejvhodnější materiál. Bakterie na polyuretanových nanovláknenných sítích mají nejrychlejší kinetiku růstu, a to především v počátcích kolonizace (v rámci několika prvních dnů), což hraje důležitou roli například při znovu-zpracování systémů po havarijních stavech, kde komerční nosiče v podobných případech zcela selhávají.



Obrázek 54 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích PES (1, 7, 21, 35 den kolonizace)



Obrázek 55 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích PUR (1, 7, 21, 35 den kolonizace)



Obrázek 56 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích PVB (1, 7, 21, 35 den kolonizace)

b) Výběr materiálu na základě měření bioaktivity biofilmu (měřením respirace)

Respirační testy byly prováděny jako kinetické testy s biomasou na nosiči. Cílem testů bylo vyjádření specifické respirační rychlosti (resp. aktivity mikroorganismů), která připadá na biomasu fixovanou na nosičích, a to v přítomnosti daného typu nanovláknenného nosiče (PES, PUR, PVB). Kolonizace nosičů probíhala 3 týdny, poté bylo cílem nalézt maximum objemové či specifické respirační rychlosti.

Pro testování byla použita modelová voda s obsahem glukosy jako dominantním C-zdrojem (max. 300 mg/l). Bakteriální populace pocházela z aktivační nádrže reálné čistírny odpadních vod Bochemie Bohumín a.s., bakteriální kal obsahoval smíšenou bakteriální populaci.

Tabulka 4 – Hodnocení bioaktivity biofilmu měřením respirace

Podmínky experimentu	sušina	$r_{V, H, \max}$	$r_{X, H, \max}$
	[g/l]	[g/(l.hod)]	[g/(g.hod)]
PES + voda *	0.2112	128.32	607.59
PUR + voda *	0.4480	230.64	514.82
PVB + voda *	0.6528	245.26	375.71

* Vzorek obsahoval biomasu fixovanou na nosiči, voda pocházela z ČOV a neobsahovala bakteriální suspenzi.

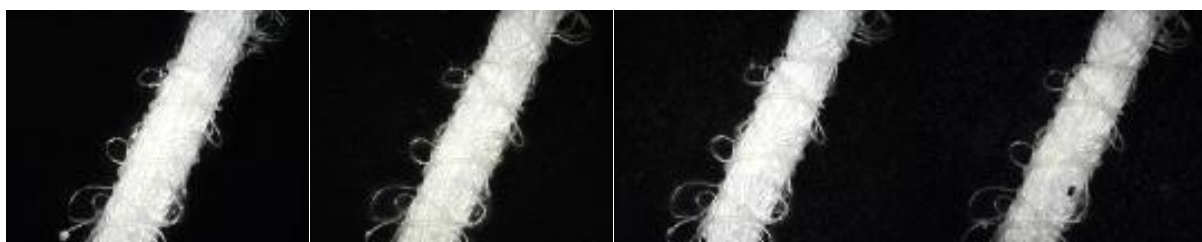
Sušina po třech týdnech kolonizace byla na všech typech nanovláknenných nosičů výrazně rozdílná. Z naměřených hodnot specifické respirace plyne, že respirace nejrychleji probíhala při testech s biomasou fixovanou na nanovláknenných nosičích typu PES, kde ale byly na druhou stranu pozorovány nejnížší hmotnosti fixované biomasy (což při testech kolonizace není vhodným závěrem). Druhým nejlépe hodnoceným nosičem byl PUR, který již obsahoval vyšší hmotnost biomasy. Nosič s PUR nanovláknem potvrzuje svou vhodnost pro nosič biomasy, která byla potvrzena i v následujících testech.

c) Výběr materiálu na základě hodnocení stability nanovláknenného pokryvu

Některé druhy polymerních nanovláken vykazují mnohem lepší stabilitu než jiné. Test byl hodnocen za základě mikroskopického sledování shodného místa nosiče před a po jeho aplikaci do reaktorové nádrže (přesné sestavení experimentu se shoduje s *kapitolou 2.2.4 a*).

Výstupem měření je sestupná stabilita těchto typů nanovláken: PVB > PUR > PES. Pro nanovlákná PUR pak sestupně stabilními jsou Nános 50 dtex > Nános 30 dtex > Nános 100 dtex.

Nutné je brát také v úvahu i další specifikace materiálu. Nejlepší charakteristiky vykazuje polyuretan (PUR), který je mimo jiné také optimálně biokompatibilní, velice stabilní (mechanicky i chemicky), vysoce odolný proti otěru, současně je velice pružný a nepraská. Povrchová fixace dodatečným vláknem je naprosto nezbytná pro zabránění dezintegrace nanovláken, přídavnou fixací je stabilita vláken mnohem vyšší. Předcházet unikání nanovláken do životního prostředí lze prvotním oplachem nanotextilie před jejím použitím (viz další testy *dle kapitoly 2.2.4.*).



Obrázek 57 – Polyethersulfonová (PES) nanovlákná s fixací; 0, 7, 14, 21 den sledování dezintegrace



Obrázek 58 – Polyvinyl butyralová (PVB) nanovlákná s fixací; 0, 7, 14, 21 den sledování dezintegrace



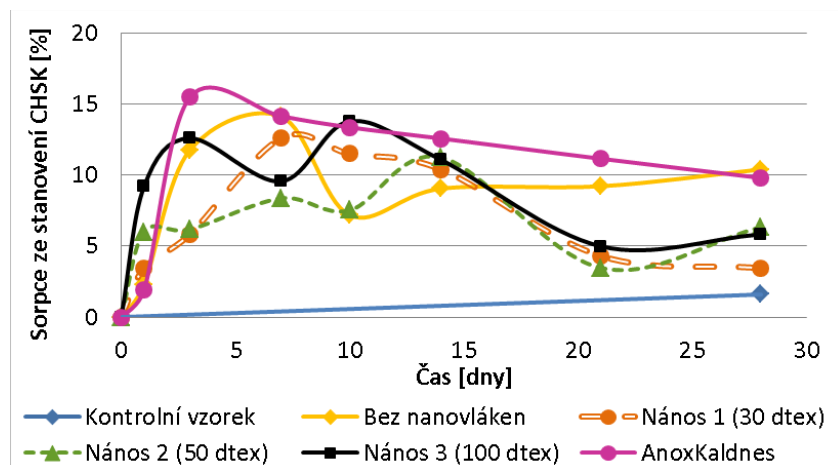
Obrázek 59 – Polyuretanová (PUR) nanovlákná s fixací; 0, 7, 14, 21 den sledování dezintegrace

d) Výběr materiálu na základě hodnocení testů sorpce

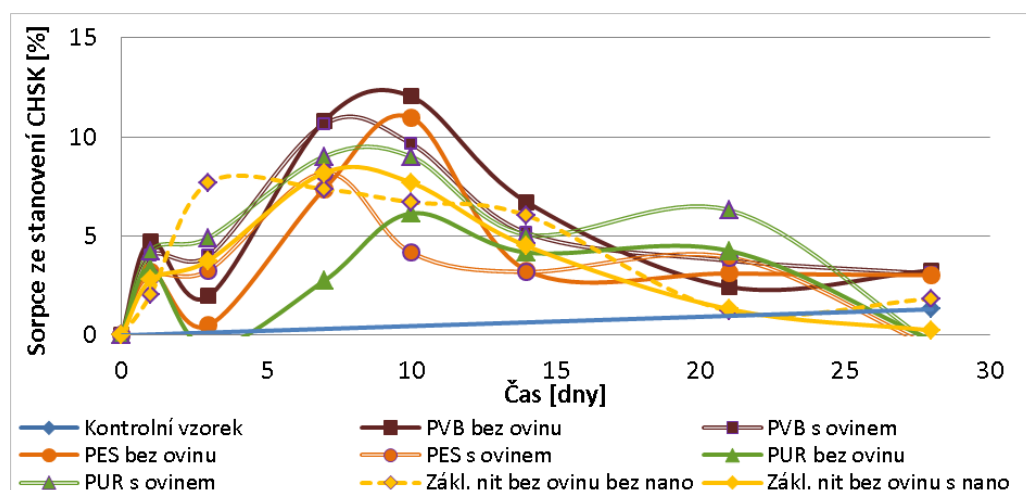
Mikroorganismy využívají organické látky představované přítomnými organickými kontaminanty jako zdroj uhlíku a energie. Jestliže organismy mají k těmto látkám jednodušší přístup, využívají je mnohem rychleji a snadněji. Díky vhodné míře sorpce k povrchu nosiče lze do jisté míry ovlivňovat míru kolonizace mikroorganismy. Adsorpce kontaminantů na povrch nanovláken zvyšuje jejich dostupnost, na druhé straně roste případný toxický vliv kontaminantů.

Testy sorpce byly prováděny jako kinetické testy v uzavřených nádobách o objemu 1 l. Obsah nosičů tvořil 30 % sytného objemu nádoby, zbylý objem vyplňoval vodný roztok modelového kontaminantu

(modelové vody, specifikace dle kapitoly 1.1.2 b, o koncentrací 10 g/l anilinu), kontrolním vzorkem byla nádoba bez nosiče. Nádoby byly umístěny na horizontální třepačku a po danou dobu rovnoměrně míseny. Průběžně byla z vodného roztoku měřena chemická spotřeba kyslíku v mg/l (popis metody měření v kapitole 1.1.1), přepočtením lze vyjádřit vázané množství substrátu na nosič.



Obrázek 60 – Sorpce pro různé povrstvení nanovlákeny a sorpce pro komerční nosič



Obrázek 61 – Sorpce pro různé materiály pokryvu nosné nitě nanovlákeny

Sorpce kontaminantu na nanovláknennou niť s nejvyšší hustotou pokryvu je zřetelně vyšší, čímž lze vysvětlit nižší míru kolonizace na tento typ pokryvu (dle kapitoly 2.2.2 a). Naopak pro nízkou a střední míru pokryvu (v grafu označeno 30 a 50 dtex) je sorpce k povrchu zřetelně nižší. Usedající mikroorganismy v případě střední míry pokryvu naleznou ideální podmínky ke kolonizaci nosiče. Vysoká míra sorpce zvolených toxických kontaminantů, jako jsou anilin nebo fenoly, může ovlivňovat (zpomalovat případně až inhibovat) počáteční rychlost kolonizace povrchu mikroorganismy. Nejvhodnějším materiálem z hlediska výsledků sorpce je polyuretan, a to přesněji Nános 2 (50 dtex).

Kapitola „Výběr materiálu pro nanovláknenné vrstvy“ shrnuje základní poznatky ohledně výběru materiálu na základě výsledků z měření kolonizovatelnosti povrchu, bioaktivity vzniklého biofilmu, stability nanovláken a dle výsledků z měření sorpce k povrchu nosné nitě. Všechny zde uvedené výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.

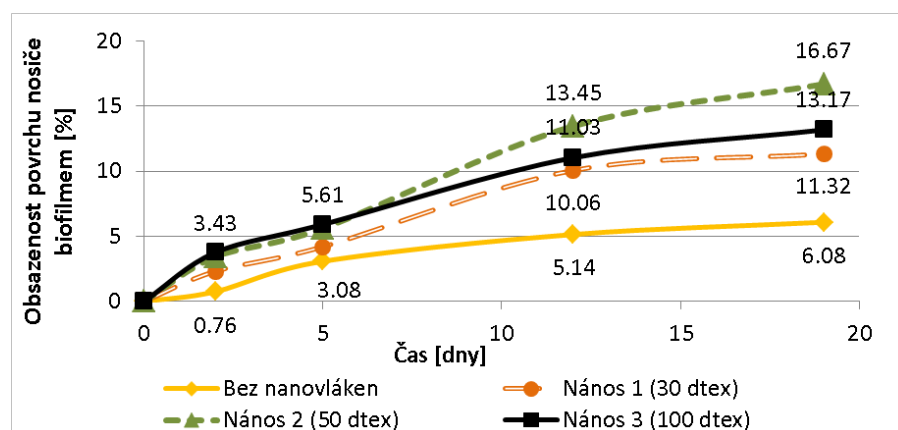
Na základě výsledků byl z několika možných polymerů selektován jeden, který byl následně verifikován v navazujících testech hodnocení míry povrstvení. Nejvhodnějším polymerem pro nanovlákněnou vrstvu byl vybrán polyuretan.

2.2.3 Stanovení ideálního množství nanovlákněné vrstvy

Po prvním kroku, kdy bylo cílem navrhnout materiál, z něhož má být nanovlákněná vrstva vyrobena, bylo dalším cílem práce stanovit optimální zaplnění (míru povrstvení) nosného vlákna nanovrstvou. Příliš malé procento pokrytí nemusí růst biofilmu podporovat v požadovaném měřítku, rostoucí procento pokrytí na druhou stranu prodražuje výrobu a dle předchozího hodnocení sorpce může vyšší sorpce kontaminantu inhibovat bakteriální růst. Ve spolupráci s fakultou textilní byly vyrobeny čtyři druhy nanovlákněného pokrytí – Nános 0 (bez nánosu nanovláken), Nános 1 (30 dtex), Nános 2 (50 dtex) a Nános 3 (100 dtex), kde tex je jednotka užívaná v textilním průmyslu pro jemnost přize a představuje délkovou hustotu (hmotnost 1 kilometru přize v gramech, 300 tex = 30 dtex). Nanovlákněné pokrytí bylo vyrobeno z polyuretanu (materiál nanovláken byl zvolen v předcházejícím testu).

Pro testování byla použita modelová voda s obsahem anilinu jako dominantním C-zdrojem (specifikace v kapitole 1.1.2 b). Nanovlákněná nit (specifikace v kapitole 2.2.1 a, dle obrázku 39, vzorek C, kde podkladová nit byla bílá, aby bylo možné sledování kinetiky růstu) byla umístěna do reaktoru (specifikace v kapitole 1.4). Hodnocení kinetiky růstu biofilmu probíhalo dle vyvinutého algoritmu (metoda uvedena v kapitole 4). V daném čase byl každý vzorek nosiče snímán šestkrát, uvedené hodnoty jsou průměrem těchto šesti hodnot.

Cílem experimentu bylo studium vlivu přítomnosti nanovlákněné vrstvy, zda je nanovlákněná vrstva výhodnější pro kolonizaci bakteriální populace či nikoli (resp. do jaké míry podporují nanovlákněné vrstvy bakteriální kolonizaci) a jaká míra pokrytí (hustota nanovláken na podložní niti) je nejvhodnější.



Obrázek 62 – Časový vývoj růstu biofilmu na různých typech nano-nosičů (různé povrstvení)

Bylo nalezeno určité optimum hustoty nánosu nanovláken typu polyuretan. Různorodost kinetiky růstu buněčných populací na jednotlivých typech vláken si vysvětlujeme kombinací protichůdných procesů. Malá vrstva (30 dtex) nepodporuje dostatečně mikrobiální růst, měrný povrch je díky menší hustotě nanovláken nižší. Naopak robustní vrstva (100 dtex) díky významné sorpci toxických

xenobiotik na povrch vláken (viz výsledky v předchozí kapitole) způsobuje vyšší koncentraci xenobiotik na povrchu nosiče a může působit inhibičně. Silná vrstva nanovláken je i více finančně náročná, což by prodražilo cenu výroby.

Z obrazového hodnocení časového vývoje nárůstu biofilmu na nosičích lze usuzovat, že nejvhodnější formou z hlediska rychlosti kolonizace, je hustota nanovlákněné vrstvy s označením „Nános 2“ (50 dtex). Na základě tohoto výsledku byly vyrobeny fixní a sférické nosiče (v kapitole 2.2.1 b, c), které byly testovány ve fixním či fluidním loži a porovnávány s komerčními nosiči AnoxKaldnes (ověření nosičů v kapitole 3.1).



Obrázek 63 – Fotografie časového vývoje růstu biofilmu pro nanovlákněný nosič Nános 2 (50 dtex)

Kapitola „Stanovení ideálního množství nanovlákněné vrstvy“ shrnuje základní poznatky ohledně selekce vhodného povrstvení základního vlákna nanovlákně. Všechny uvedené výsledky byly měřeny a zhodnoceny v rámci předkládané disertační práce.

Měření stanovuje, že ideální míra povrstvení je hodnota „Nános 2“, tj. 50 dtex (jednotka odpovídá hmotnosti 1 kilometru příze v gramech).

2.2.4 Testy dezintegrace nanovláken

Aplikace nanovlákněných nosičů do čistíren odpadních vod s sebou přináší možnost potenciálního zanesení recipientu částicemi, které mohou z nosičů unikat. Únik může nastat především v počáteční fázi kolonizace, ihned po nasazení nosičů, před prvotní kolonizací bakteriální populace. Předpokladem je, že po kolonizaci nanovláken biofilmem již k dezintegraci docházet nemůže (biofilm zakrývá a stabilizuje nanovrstvy). Nanovlákněné nosiče nejsou monolitické, ale jsou složeny z několika dílů (základní nit, nanovlákněná vrstva, fixační nit) a právě z toho důvodu může potenciálně nastat situace, že se některý z dílů uvolní do okolního prostředí. Předpokladem je, že nejvyšší tendenci k uvolňování budou mít nanovlákněné vrstvy. Cílem hodnocení bylo navrhnout a vyhodnotit testy stability, resp. dezintegrace nanovláken ze základní nitě. Cílem experimentu bylo sledovat, jak se mohou nanovlákněná uvolňovat (resp. formovat) ve chvíli, kdy ještě nejsou kolonizována.

Testy hodnocení kompaktnosti nanostruktur (resp. testy dezintegrace a stability nanovrstev) probíhali více než rok. Převážnou dobu trvalo vypracování metodiky, jelikož podobné testy nebyly v podobném měřítku v žádné publikaci sledovány. Zde uvedený návrh metodiky je prozatím pouze příklad, jak vlákna hodnotit, nejedná se o běžně používanou metodu.

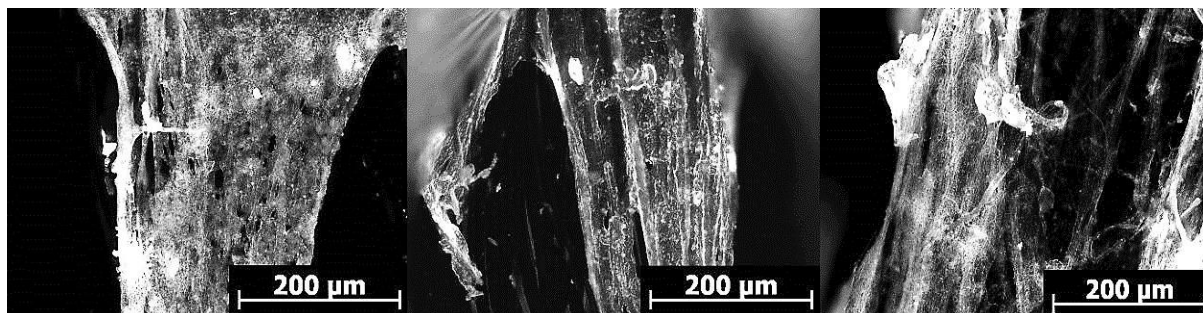
Návrh metodiky sledování dezintegrace nanovláken zahrnoval tři druhy hodnocení, a to hodnocení stability nanovláken přímou metodou pomocí fluorescenčního mikroskopu, hodnocení dezintegrace

nanovláken pomocí filtrace a nakonec ověření stability pomocí textilního barviva. Jednotlivé přístupy jsou rozebrány níže.

Testy dezintegrace byly prováděny v kádinkách o objemu 1000 ml s objemem vody 800 ml, do nichž bylo ponořeno mikroskopické sklíčko s navinutou nanovláknennou textilií. Aby byly navozeny reálné podmínky při čištění odpadních vod, byla kádinka probublávána jemnou bublinou. Testy probíhaly bez bakteriální populace. Pomocí fluorescenčního mikroskopu byly následně snímkovány povrchové vrstvy nanovláken. Díky fixaci vláken na mikroskopickém sklíčku bylo možné pozorovat stejné místo na vláknu po celou dobu experimentu. Hodnocení vzorků probíhalo mikroskopickým pozorování povrchu nosné nitě (resp. jeho procentuálním zaplněním nanovláknem a porovnání nitě v počátečním a koncovém čase experimentu).

a) Hodnocení stability nanovláken přímou metodou pomocí fluorescenčního mikroskopu

Využití fluorescenčního mikroskopu je příhodné díky přirozené fluorescenci nanovláken v UV světle (odlišení nanovláken od nosné nitě). Metoda vyžaduje nejmenší přípravu vzorku ze všech navrhovaných přístupů a zároveň umožňuje přímé hodnocení nanostruktur.

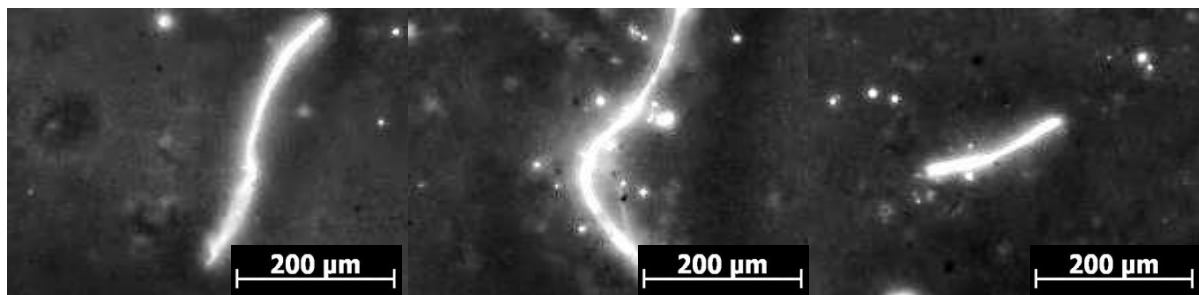


Obrázek 64 – Detail nanovrstvy před aplikací a po sedmém a patnáctém dni vlivu střížných sil na nosič

Výsledkem experimentu je 100% stabilita nanovláknenných vrstev během prvního týdne aplikace nosičů v reaktoru. Během druhého týdne dochází k částečnému poškození struktury vláken. Vlákná se v tomto týdnu především shlukují k sobě navzájem, čímž dochází k redukci měrného povrchu. Ve třetím týdnu již dochází k potrhání nanovláknenné vrstvy a k jejich mírné destabilizaci. V průběhu celého experimentu uniká do okolního prostředí jen malé množství vláken, jsou to především ta vlákna, která nejsou dobře fixována již při výrobě. Kvantifikace uniklých nanovláken je hodnocena níže.

b) Hodnocení odtržených nanovláken pomocí filtrace a fluorescenčního mikroskopu

Test hodnocení dezintegrace nanovláken pomocí filtrace vychází z bodu a) kde v tomto případě nejsou hodnoceny nitě, ale voda, v níž byly umístěny testované vzorky. Voda byla důkladně homogenizována (především, aby se případně uvolnili vlákna přichycená na stěny kádinky). Voda byla filtrována přes membránový filtr o porozitě 0.22 µm. Vlákná mají sice malý průměr, ale jsou dostatečně dlouhá, aby se na filtru mohla zachytit. Po zaschnutí byla snímkována uvolněná vlákna na membránovém filtru pomocí fluorescenčního mikroskopu.



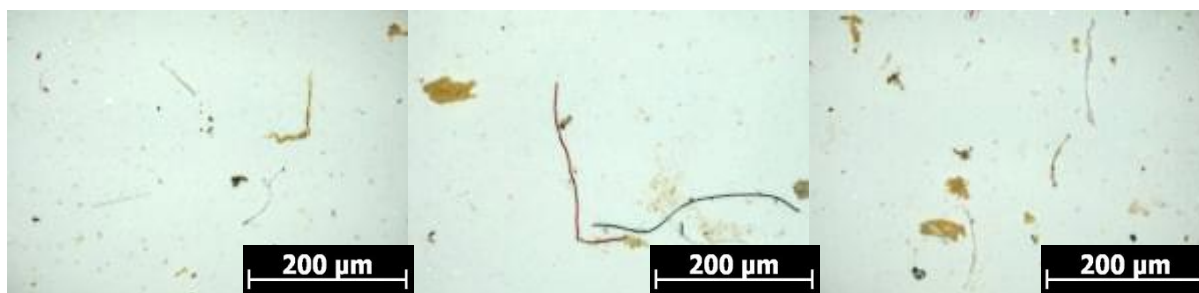
Obrázek 65 – Snímkování povrchu membránového filtru pod fluorescenčním mikroskopem (voda byla filtrována po 15.dni experimentu dezintegrace)

Výsledkem sledování povrchu membránového filtru (po filtraci vodného média z kapitoly a) je velmi malé množství nanovláken (průměrně 0.5 % povrchu filtru obsahovalo nanovláčka).

c) Hodnocení odtržených nanovláken pomocí textilního barviva

Barvení vláken probíhalo pomocí barvy na textil Javana. Barveny jsou nejen nanovláčka, ale kompletně celá nit. Oproti předchozí metodě, kdy jsou vizualizovány a hodnoceny pouze nanovláčka, jsou v této metodě hodnocena všechna vlákna, která mohou do okolního prostředí unikát.

Příprava barvy probíhala dle návodu (rozmíchání barviva v 1 litru vody a přisypání 3 lžic soli, dále se roztok neustále míchá). Po rozmíchání barvy se do nádoby vloží podložní sklo se vzorky nanovláken. Po 30 minutách vystavení vláken barvivu se nanovláčka nechají oschnout, poté se propláchnou ve studené vodě a opět nechají oschnout (osychání může trvat až jeden den). Textilní barvou bylo obarveno 75 m nitě (specifikace v kapitole 2.2.1, obrázek 39, vzorek E). Po vychladnutí a osušení byla obarvená vlákna vložena do 2 l skleněné nádoby naplněné 1 l destilované vody, do nádoby byl vložen aerátor pro jemně-bublinnou aeraci. Nanovláčka umístěná v nádobě byla připevněna na vhodné závaží, aby nitě volně vzlínaly od dna k hladině za neustálé aerace. Experiment byl provozován po dobu 4 týdnů. Každý týden bylo odebráno 250 ml vody. Voda s vlákny byla předem řádně homogenizována. Odebraná voda byla přefiltrována přes membránový filtr o porozitě 0.22 μm. Vysušené filtry byly snímány optickým mikroskopem BX51M při celkovém zvětšení 50x. Pro každý vzorek bylo zachyceno 30 snímků. Nakonec byla provedena obrazová analýza programem QuickPHOTO MICRO 2.3, v němž byly hodnoceny celkové počty vláken uchycených na filtru.

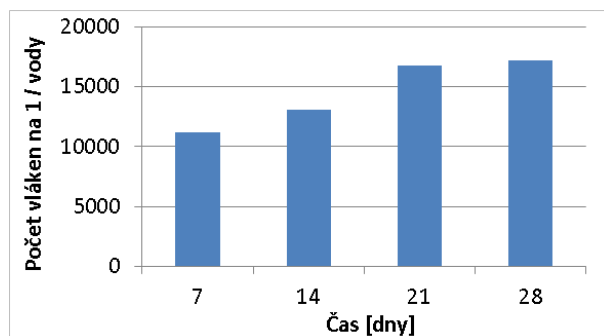


Obrázek 66 – Snímkování povrchu membránového filtru optickým mikroskopem

Hlavním hodnotícím parametrem výše uvedených metodik bylo hodnocení parametru „počet uvolněných vláken“, které byly zachyceny na povrchu filtru. Vyhodnoceny byly průměrné počty vláken na jednotlivých snímcích, resp. průměrný počet vláken na 1 l vody.

Tabulka 5 – Počet vláken na filtru při hodnocení dezintegrace

Dny	Počet vláken [Ks]	
	Průměr/filtr	Průměr/1 l vody
7	2799.78	11199.10
14	3270.14	13080.55
21	4188.46	16753.86
28	4300.46	17201.82



Obrázek 67 – Počet vláken na filtru z délky 75 m nitě do 1 l vody

Výše uvedená tabulka a graf (platí v malé obměně pro všechny výše uvedené metodiky). Z grafu plyne, že za využití jemně-bublinné aerace dochází časem k ustálené hodnotě dezintegrace nanovláken z podkladové nitě. Tento závěr i průběh experimentu platí pro všechny zde uvedené metodiky. V poslední metodice však otázkou stále zůstává, zda uvolněná vlákna pochází z nosné nitě, či zda jsou to opravdu části nanovláknenné vrstvy. Doposud nebyl nalezen žádný vhodný způsob, jak jednotlivá (nano)vlákna jednoznačně rozlišit a kvantifikovat jejich odtrhávání (dezintegraci) z nosné nitě.

Výsledkem hodnocení dezintegrace je možnost použití nanovláken i pro pomalu rostoucí mikroorganismy, kdy k zapracování nosiče dochází pomalu a možnost uvolňování nanovláken je nejvyšší možná. Pro reálné aplikace plyne nutnost oplachovat nanovláknenné nosiče proudem vody a následně vodu filtrovat. Nutnost filtrace je uvažována pouze v případě, kdy za bioreaktorem není dosazovací nádrž. Celá metodika určování dezintegrace nanovrstev je zásadní ve chvíli kdy mohou odtoky z čistíren vstupovat přímo do přírodních vod.

Kapitola „*Testy dezintegrace nanovláken*“ shrnuje základní poznatky ohledně možného odpoutávání nanovláknenných struktur z povrchu základní nitě. Všechny zde uvedené výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce. V případě kapitoly (c), *Hodnocení odtržených nanovláken pomocí textilního barviva*, bylo měření provedeno ve spolupráci s Ing. Tomášem Dubem, jelikož dané měření bylo také předmětem řešení projektu BioCar (Modifikované nosiče biomasy pro čištění odpadních vod, TA01021764, TA ČR – program ALFA, 1/2011 – 6/2014).

Výsledkem měření bylo zjištění, že k odtrhávání nanovláken z povrchu nitě nastává, časem však dochází k jistému ustálení. Pokud se před reálnou aplikací tyto nosiče opláchnou proudem vody, dojde k nejmasivnějšímu odtržení volných vláken, které se pak dále do recipientu šířit nebudou. V další fázi se díky morfologii povrchu předpokládá kolonizace biofilmem a odtrhávání vláken se již nepředpokládá.

2.2.5 Testy toxicity

Výsledkem předchozí kapitoly byl závěr, že při aplikaci nanovláknenného nosiče do vodného prostředí skutečně dochází k uvolňování nanovláknenných vrstev. Neopomenutelným důsledkem může být potenciální riziko těchto částic na vodní živočichy, především na vyšší organismy (toxicita na mikroorganismy se nepředpokládá).

Bohužel testy toxicity polymerních nanovláken nebyly dosud publikovány, proto se ani v tomto testu nejedná o standardně používanou metodiku, ale o metodiku vyvíjenou v rámci předkládané disertační práce. Pro testy toxicity byly připraveny dva vzorky nanovláken typu polyuretan o průměru vláken cca 260 nm (označení PUR-260).

a) Aerovaný vzorek

Nanovláknena byla do daného roztoku uvolňována spontánně pomocí aerace. Vzorek byl připraven ze 75 m nanovláknena PUR-260 o celkové váze 9.4425 g. Zatížený vzorek byl vložen do skleněné nádoby o objemu 2 l naplněné 1 l destilované vody. Do nádoby byl vložen aerátor pro jemně-bublinatou aeraci. Vzorek byl provzdušňován 28 dní.

b) Odvážení nanovláken

Naváženo bylo 100 mg nanovláken PUR-260. Při přípravě tohoto vzorku se vyskytovaly problémy s nedostatečnou homogenizací navážených vláken, zejména při oddělování nanovláknenné vrstvy z nosné látky. Po oddělení se jemné nanovláknenné vrstvy začaly spojovat k sobě navzájem do tzv. žmolků. Homogenizace vzorku nanovláken byla nejprve zajištěna mechanickým mlýnkem, avšak výsledkem byla agregace nanovláken do větších žmolků, a to i za použití křemičitého písku jako podpůrného prostředku pro mletí. Z výše zmíněných důvodů byla nanovláknena homogenizována rozstříháním žmolků na menší části, s tím, že části byly následně roztrhány pomocí pinzety. Zhomogenizovaný vzorek byl vložen do 1 l destilované vody.

Do obou vzorků byly přidány tzv. zředovací roztoky, které se připraví smícháním 2.5 ml zásobních roztoků A, B, C, D v 1 l deionizované vody (tabulka 6 níže). Zředovací voda měla pH 7.8 ± 0.2 a byla nasycena kyslíkem při teplotě 20 – 24 °C.

Tabulka 6 – Složení zředovacích roztoků pro testy toxicity

Roztok	Chemikálie	Množství [g]
A	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	117.6
B	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	49.3
C	NaHCO_3	25.9
D	KCl	2.3

U vzorků byl proveden test „akutní imobilizace dafnií – VP 23/E“, a to v akreditované laboratoři: Výzkumný ústav organických syntéz a.s., Centrum ekologie, toxikologie a analytiky, Rybitví 296, 533 54 Rybitví, Zkušební laboratoř č. 1057, akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17025. (Novák, Křiklavová, Lederer, 2012)

Testovací metoda byla provedena dle normy ČSN EN ISO 6341 (1997) *Jakost vod – Zkouška pohyblivosti Daphnia magna (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity*. Vzorek byl uchováván v uzavřené lahvi při teplotě cca 4 °C. (Novák, Křiklavová, Lederer, 2012)

Testovacími organismy byly zvoleny *Daphnia magna* získané acyklickou parthenogenezí, z laboratorního chovu dané akreditované laboratoře. Dafnie byly odpočítány do testu a byly krmeny směsí řas. Pro předběžnou zkoušku bylo použito pro každou koncentraci a kontrolu 10 dafnií, pro limitní zkoušku bylo použito pro každou koncentraci a kontrolu 20 dafnií. Limitní zkouška byla provedena v triplicátu. Imobilizace dafnií byla sledována po 24 a 48 hodinách zkoušky. Přesné výsledky jsou uvedeny v Příloze A (v závěru disertační práce). (Novák, Křiklavová, Lederer, 2012)

Část testů hodnocení ekotoxicity – Aerovaný vzorek

Vyhodnocení zkoušky akutní imobilizace dafnií

EC₅₀ (24h) = nelze stanovit

EC₅₀ (48h) = nelze stanovit

V limitní zkoušce nebyla pozorována statisticky významná imobilizace dafnií. Hodnoty EC 50 nelze vyhodnotit. (Novák, Křiklavová, Lederer, 2012)

Část testů hodnocení ekotoxicity – Odvážení nanovláken

Vyhodnocení zkoušky akutní imobilizace dafnií

EC₅₀ (24h) = nelze stanovit

EC₅₀ (48h) = nelze stanovit

V limitní zkoušce nebyla pozorována statisticky významná imobilizace dafnií. Hodnoty EC 50 nelze vyhodnotit. (Novák, Křiklavová, Lederer, 2012)

Výsledky měření toxicity nanovláken neprokázali žádný významný vliv imobilizace na vyšší organismy (*Daphnia magna*). Ovšem stále vyvstává myšlenka, zda a v jaké míře může nastávat bioakumulace těchto částic (nanovláken) v organismech. V potravním řetězci by tato myšlenka mohla být zásadní a je nutné ji dále ověřit.

Kapitola „*Testy toxicity*“ shrnuje základní poznatky ohledně možného toxického působení odtržených nanovláčkových částic na vodní organismy (*Daphnia magna*). Testy akutní imobilizace dafnií byly provedeny v akreditované laboratoři „*Výzkumný ústav organických syntéz a.s., Centrum ekologie, toxikologie a analytiky, Rybitví 296, 533 54 Rybitví, Zkušební laboratoř č. 1057, akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17025*“. Vyhodnocení, reprezentace a publikace dat bylo provedeno autorem disertační práce.

V limitní zkoušce nebyla pozorována statisticky významná imobilizace dafnií (hodnoty EC 50 nelze vyhodnotit).

2.2.6 Testy oplachu nosiče vodou a chrom-sírovou směsí

Komerční nosiče, které jsou v dnešních dnech na ČOV standardně užívány, byly dlouhodobě testovány pro všechny stěžejní parametry (dle kapitoly 1.7.1 teoretické části práce). Nanovláknenný nosič, který byl v rámci této disertační práce vyvíjen, nebyl testován na všechny možné stavy, které mohou v reálné praxi nastat. Avšak jedním z několika důležitých parametrů je nutnost několikanásobného použití nosiče, jinak by finanční náročnost daného nosiče byla nepřiměřeně vysoká. V rámci testu hodnocení oplachu nosiče bylo cílem zhodnotit, jak bude vypadat nanovláknenná vrstva po kolonizaci (resp. po narušování nano-vrstvy) biofilmem.

Pro test bylo využito nanovláknenné textilní pleteniny, která byla předem dlouhodobě kolonizována bakteriální populací (více než čtyři měsíce). Biofilm přirostlý na pletenině byl smýván dvěma rozličnými přístupy. První omývání probíhalo pouze vodou, která byla prostříkována skrze nosič. Druhé omývání probíhalo za využití chrom-sírové směsi, v níž byl nosič omýván pouze za občasného míchání po dobu čtyř hodin (metodika smývání biofilmu odpovídala metodice hodnocení sušiny na nosiči, dle kapitoly 1.2.3). Hodnocení kompaktnosti nanostruktur a zbytkového biofilmu proběhlo pomocí optického mikroskopu (dle kapitoly 1.2.4.). Testování oplachu vodou (resp. chrom-sírovou směsí) je nezbytné hodnotit především z důvodu možnosti znovupoužití nosiče při reálných aplikacích na ČOV, což je především vzhledem k ceně nosiče neopomenutelným hlediskem.



Obrázek 68 – Kolonizovaný nosič před oplachem (s biofilmem); Test oplachu nosiče vodou a chrom-sírovou směsí (mikroorganismy jsou na obrázku zbarveny lehce žluto-hnědě)

Výsledkem testů oplachu nosiče vodou je minimální porušení nanovrstev, ale na úrok zbytkové populace mikroorganismů na nosiči. Testy oplachu chrom-sírovou směsí ukázaly, že nanovrstva je poškozena (došlo k shluknutí nanovláken), ale populace na nosiči je zcela vymýcena. Nanovláknenný nosič je možné využívat pro opakovanou kolonizaci mikroorganismy, ale za určitých podmínek. Omývání biomasy z jeho povrchu vodou není sice 100% účinné pro odstraňování biomasy, ale je šetrné k nanovláknenným strukturám. Pro provoz v čistírnách odpadních vod je omývání vodou zcela postačující. Naopak využití chrom-sírové směsi je sice účinné, ale prakticky náročné, navíc její použití poškozuje nanovrstvu a dochází ke snížení měrného povrchu nosiče.

Kapitola „Testy oplachu nosiče s biofilmem“ shrnuje základní poznatky ohledně možností znovupoužití nanovláknenného nosiče jako nosiče biomasy pro reálné aplikace na čistírnách odpadních vod. Všechny uvedené výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.

Výsledkem práce je potvrzení vhodnosti nanovláknenných struktur pro reálné aplikace při čistírnách

odpadních vod. Potvrzeno bylo, že oplach proudem vody nenarušuje nanovláknenné struktury na povrchu základní nitě a nosič je možné použít pro další kolonizaci.

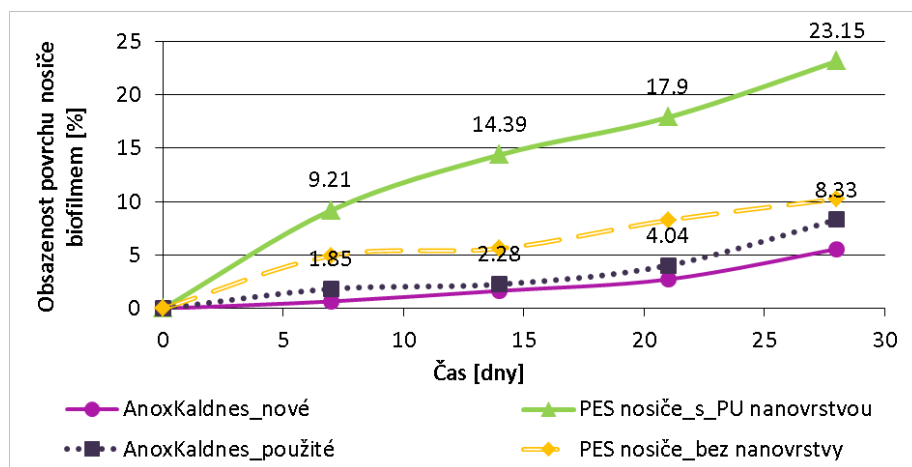
2.2.7 Kolonizace nosiče, sledování vývoje biofilmu

V rámci testování nanovláknenných nosičů a možností jeho kolonizace probíhalo komparativní měření rychlosti vývoje biofilmu v porovnání s komerčním nosičem AnoxKaldnes (specifikace v kapitole 1.7.3 teoretické části práce). Hodnocení kolonizace mikroorganismů na nosičích probíhalo ve třech systémech, a to jako krátkodobá kultivace nosiče a dlouhodobá kultivace nosiče, třetím systémem bylo hodnocení možností re-kolonizace (resp. možností znovupoužití nosiče). Mikroskopické pozorování nosičů probíhalo pravidelně v danou dobu od prvotního nasazení nosičů do reaktoru. Obrazy byly snímkovány pomocí optického mikroskopu a vyhodnoceny obrazovou analýzou, při níž se hodnotilo procentuální zaplnění povrchu nosiče bakteriální populací (kapitola 4.5.1, bod 1).

a) Krátkodobá kultivace nosiče (kolonizace)

Pro testování byla použita reálná průmyslová odpadní voda s obsahem anilinu jako dominantním C-zdrojem v řádu prvních jednotek g/l (dle kapitoly 1.1.2 a). Výsledkem experimentů jsou následující zjištění.

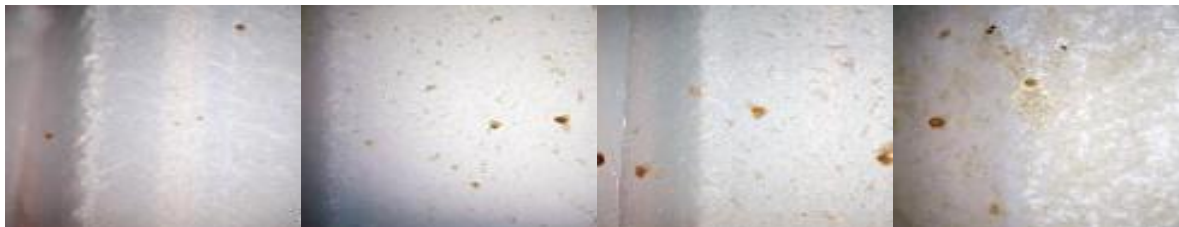
Na komerčních polyethylenových nosičích AnoxKaldnes se bakteriální biofilm uchycuje významně pomaleji než na nanovláknenných nosičích. Pomalý nárůst je zapříčiněn nedostatečnou adhezí mikroorganismů k povrchu nosiče, resp. povrchovou morfologií tohoto typu nosiče. V testu byly použity již jednou kolonizované (a před testem opláchnuté) nosiče, které vykazují mírně lepší výsledky. Pokud je povrchová struktura nosiče příhodnější, pak bakterie nemusí vynakládat energii k narušení povrchových struktur (resp. nemusí optimalizovat jeho morfologii). I pro totožný typ nosiče lze dosáhnout povrchovou úpravou (narušením svrchní vrstvy například v kyselině nebo předkolonizováním nosiče) snazší adheze mikroorganismů a tím rychlejší kolonizace.



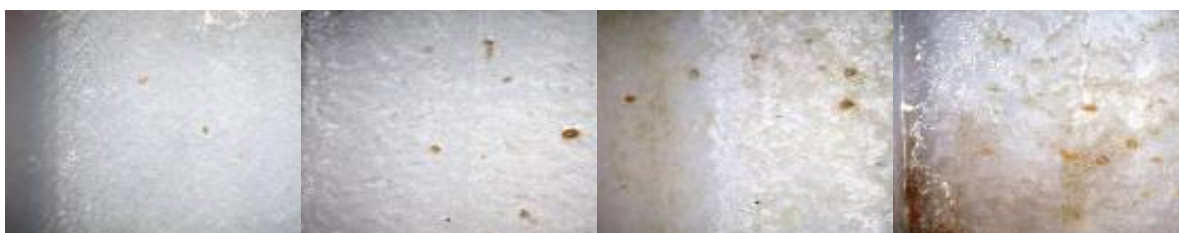
Obrázek 69 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích (krátkodobá kultivace)

Na nanovláknenné vrstvy usedají mikroorganismy hojně již v prvních dnech kultivace. Vlákenné nosiče (i bez nanovláknenné vrstvy) jsou svým průběhem nárůstu biofilmu až dvakrát rychlejší než komerční

nosič AnoxKaldnes. Výraznějšího růstu mikroorganismů na nosiči vykazují nosiče s využitím nanovrstvy, na nichž biomasa usedá dokonce až více jak čtyřikrát lépe. Po delší době kolonizace se biofilm přirozeně rozrůstá i na místa bez nanovláken (tj. na základní podložní nit, nebo na nit fixní). Přítomnost nanovrstev je nezbytná především pro úvodní kolonizaci (resp. pro podpoření rychlosti kolonizace).



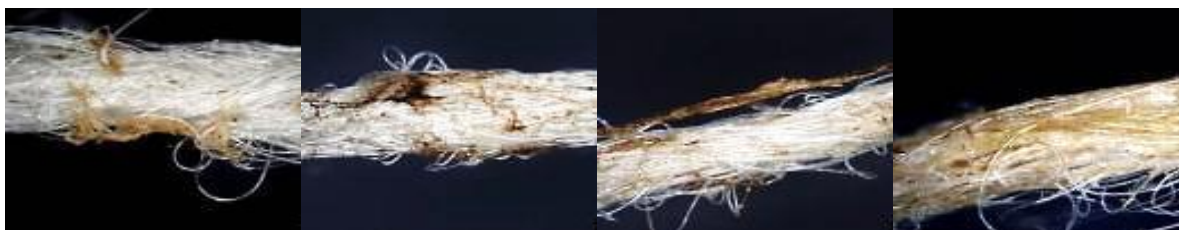
Obrázek 70 – Fotodokumentace časového vývoje růstu biofilmu na nosiči AnoxKaldnes (nový)



Obrázek 71 – Fotodokumentace časového vývoje růstu biofilmu na nosiči AnoxKaldnes (již jednou kolonizovaný)



Obrázek 72 – Fotodokumentace časového vývoje růstu biofilmu na nosiči PES (bez nanovrstvy)



Obrázek 73 – Fotodokumentace časového vývoje růstu biofilmu na nosiči PES (s nanovrstvou)

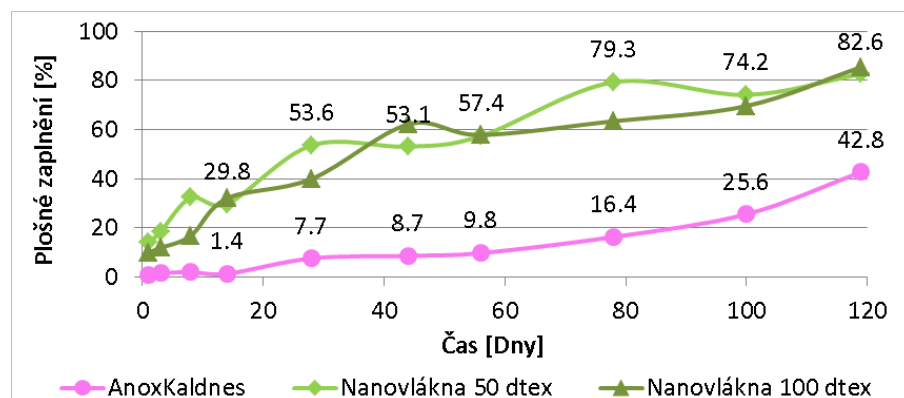
b) Dlouhodobá kultivace nosiče (kolonizace)

Testy dlouhodobé kultivace měli potvrdit, vhodnost a aplikovatelnost nanovláknenného nosiče v dlouhodobém měřítku. Hlavní otázkou je, jak se bude biofilm vyvíjet na nanovláknenných strukturách po více než jednom měsíci kolonizace, zda a jak budou nanovláknena na podkladové niti příhodná i pro mohutnější biofilm (nejen na počátku kultivace).

Pro testování byla použita reálná průmyslová odpadní voda s obsahem fenolů jako dominantním C-zdrojem (řádově stovky mg/l, dle kapitoly 1.1.3 a), další parametry reaktoru jsou uvedeny v kapitole 1.4.

Výsledkem experimentu bylo potvrzení významně rychlejší charakteristiky narůstání biofilmu na povrchu nanovláknenného nosiče, především během prvotní kolonizace (tj. během prvních 14ti dnů kultivace). Na konci druhého týdne kultivace byla na nanovláknenném nosiči pozorována biomasa cca. 20x vyšší než na nosiči AnoxKaldnes (29.8 / 1.4). V průběhu druhé fáze kultivace, tj. v období 28 – 56. dne kultivace, biomasa na nanovláknenném nosiči stále mírně roste, ale na nosiči AnoxKaldnes je kinetika růstu prakticky konstantní. V daném období bylo na nanovláknenném nosiči cca. 6x více biomasy než na nosiči komerčním (57.4 / 9.8). V závěru experimentu (po více než 100 dnech kultivace) je nanovláknenný nosič pokryt biofilmem cca. 2x více než komerční nosič AnoxKaldnes (82.6 / 42.8).

Výsledky dále ukazují, že použití vyšší hustoty nanovláken (100 dtex) nijak více nepodporuje růst mikroorganismů, v porovnání se střední mírou pokrytí (50 dtex). Nanovláknenný nosič má významný vliv při podpoře kolonizace bakteriálním biofilmem především v počátku kultivace. Po delší době kultivace je nanovláknenný nosič stále vhodným nosičem pro bakteriální biofilm. Významné výhody nanovláknenného nosiče oproti komerčnímu nosiči AnoxKaldnes jsou uvedeny v kapitole 4 s využitím obrazové analýzy.



Obrázek 74 – Časový vývoj růstu biofilmu na nosičích (dlouhodobá kultivace)

Hydrofobita povrchu je jedním z důležitých faktorů ovlivňujících bakteriální adhezi. Bakterie *Rhodococcus erythropolis*, která má hydrofobní povrch, vykazuje lepší schopnost adheze na hydrofobní materiál, v tomto případě polyuretan. Nastává rychlejší kolonizace nanovláknenného nosiče oproti nosiči komerčnímu, k čemuž dopomáhá vysoký měrný povrch díky nano-vrstvám. Je vysoce pravděpodobné, že faktory usnadňující proces adheze a morfologická struktura povrchu díky nanovláknům mají též pozitivní vliv na fyziologické vlastnosti vzniklého biofilmu, což se následně projevuje účinnější degradací fenolu. Počáteční kolonizace nosiče je několikanásobně rychlejší a výsledný biofilm je mohutnější a dosahuje vyšších aktivit. Stabilita a plocha aktivního biofilmu může být vyšší než na běžných nosičích.



Obrázek 75 – Obrazová dokumentace vzorků pro stý den kultivace (AnoxKaldnes, Nanovlákná 50 dtex, Nanovlákná 100 dtex)

c) Několikanásobná rekolonizace nosiče

Pro reálné aplikace nanovláknenných nosičů je nutné potvrzení jejich vhodnosti při opakovatelné kolonizaci jejich povrchu (oplachování mezi jednotlivými kolonizacemi bylo provedeno obyčejnou vodovodní vodou, která byla prostříkována skrze nosič). Laboratorní experimenty se věnovali možnosti opětovného použití nanovláknenného nosiče, tzv. re-kolonizaci. Cílem experimentu bylo hodnocení znovu-využití nanovláknenných nosičů biomasy v laboratorním bioreaktoru (resp. posoudit možnosti opětovné kolonizace nosičů, od prvotního zapracování nosičů až po několikrát další užití již zaběhnutých nosičů).

Reaktor se skládal z bioreaktoru, jehož specifikace jsou uvedeny v kapitole 1.4. Specifikace vstupní modelové vody jsou v kapitole 1.1.3 b, kde finální koncentrace fenolu byla 220 mg/l. Průtok byl ve všech cyklech kolonizace nosičů 250 ml a doba zdržení pro reaktor o objemu 3 litry činila 12 dní. Postup získávání obrazu je uveden v kapitole 1.2.4, biofilm na nosiči byl hodnocen vyvíjenou metodou obrazové analýzy (kapitola 4). Výsledky jednotlivých měření reaktoru (vstupy, výstupy) jsou uvedeny v Příloze B.

Experimentálně byly měřeny tři cykly kolonizace, mezi kterými, byly nosiče zbaveny nárůstu biomasy dostatečným oplachem vodou. Nítě s nánosem nanovláken byly navinuty na pevný rám (10 x 10 cm) s velikostí oka cca. 1 cm. Horizontálně bylo navinuto osm nití o délce 20 cm, stejně tomu bylo vertikálně (obrázek 76 níže).

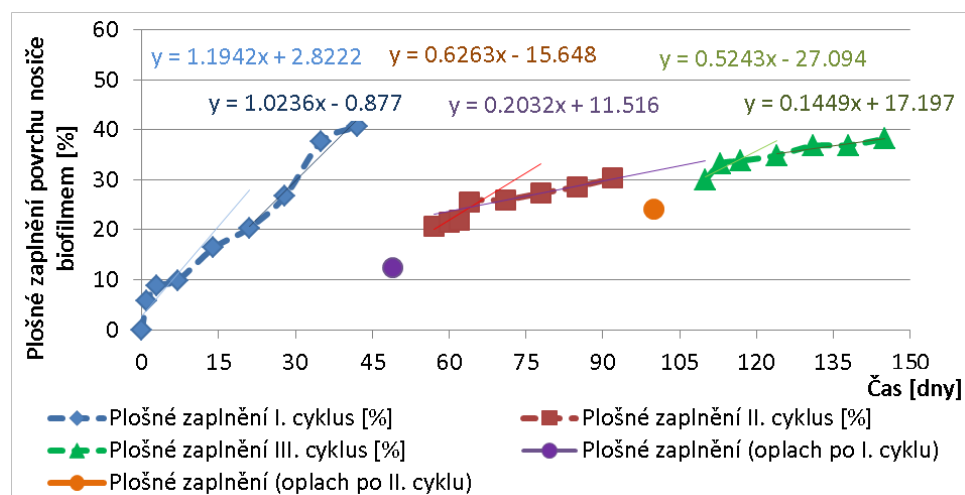


Obrázek 76 – a) Mechanismus ukotvení nití do pevného rámu, b) Pevný rám s nosiči, po jednom měsíci kolonizace, c) Sestavení laboratorního modelu

V grafu níže je vykreslena výsledná kinetika růstu biofilmu v jednotlivých cyklech re-kolonizace nosičů. První cyklus odpovídá prvotní kolonizaci nosiče (v grafu níže je cyklus označen modře), kinetika růstu biofilmu na nosiči prakticky odpovídá kinetikám získaným v předchozích kapitolách (krátkodobá, dlouhodobá kultivace).

Počáteční vyšší bod plošného zaplnění u druhého a třetího cyklu byl způsoben zbytkovým množstvím mikroorganismů v důsledku nedokonalého oplachu. Neúplný oplach finálně umožnil snadnější kolonizaci nosičů (rychlejší náběh). Pro každou etapu byl spočten index, který je vyjádřen proložením lineární křivky (zvláště pro exponenciální fázi růstu a zvláště pro lineární fázi růstu biofilmu). Index odpovídá predikci rychlosti porůstání nosiče (čím vyšší index – v rovnici před proměnnou x , tím rychleji je nosič porůstán).

Z grafu níže je zřejmé, že mezi jednotlivými cykly kolonizace existují rozdíly v rychlosti porůstání. Index porůstání se snižuje – exponenciální růst (1.19, 0.63, 0.52), lineární růst (1.02, 0.20, 0.15). Z prvního cyklu do druhého se exponenciální růst zpomalí cca. 2x, lineární růst cca. 5x. Z druhého cyklu na třetí cyklus se exponenciální růst zpomalí cca. 1.2x, lineární růst cca. 1.3x. Doba zapracování nosiče (v tomto případě dosažení plošného zaplnění nosiče cca. 35 %) je postupně v jednotlivých cyklech 35, 20 a 13 dnů. Čas zapracování nosiče se z první na druhý cyklus urychlí cca. 1.8x, z druhého na třetí cyklus cca. 1.5x. Výsledkem je sice o poznání pomalejší kinetika růstu biofilmu na nanovláknenném nosiči, ale rychlejší zapracování nosiče. Zapracování nosiče je při aplikaci na čistírnách odpadních vod nejdůležitějším parametrem, proto jeho zkracování je při tomto hodnocení podstatnějším závěrem.



Obrázek 77 – Časový průběh nárůstu biofilmu pro testy rekolonizace

Na nosičích však i po důkladném oplachu vodou zůstávají nánosy biofilmu (viz obrázky níže). Tyto nánosy pravděpodobně umožňují rychlejší rozšíření a nárůst biofilmu na nosičích v dalších cyklech kolonizace (druhý a třetí cyklus).



Obrázek 78 – Příklad zbytkového biofilmu na nosiči po druhém a třetím cyklu re-kolonizace (po oplachu). Žluto-hnědé plochy naznačují místa nedobře omyté nitě (zbytek usedlého biofilmu).

Kapitola „Hodnocení kolonizace nosiče, sledování vývoje biofilmu při krátkodobé i dlouhodobé kultivaci“ shrnuje základní poznatky ohledně utváření biofilmu na povrchu nosiče, a to jak v raných stádiích, tak po delší době v reaktoru.

Výsledky kapitoly dlouhodobé kultivace byly založeny na základě společného měření se studentem Tomášem Dubem, na základě čehož vzešel společný článek:

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., LEDERER T.: *Development of nanofiber support for use as a carrier of bacterial biomass in wastewater treatment*, NANOCON 2012, 23. – 25. 10. 2012, Brno; Sborník bude zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

Laboratorní testování ukázalo, že nanovláknina jsou efektivním nosičem bakteriálního biofilmu. V rámci krátkodobé kultivace dosahuje nanovláknenný nosič v průměru čtyřikrát vyšší míry kolonizace oproti komerčnímu nosiči. Počáteční zapracování nanovláknenného nosiče je rychlejší především díky charakteristické morfologii a vysokému měrnému povrchu. V rámci dlouhodobé kultivace (po čtyřech měsících) je pokrytí nanovláknenného nosiče více jak dvojnásobné. Měření re-kolonizace nosiče prokázalo zpomalování rychlosti kolonizace nosiče, a to pravděpodobně v důsledku zbytkové mikrobiální populace, díky které na druhou stranu nastává masivní počáteční kolonizace. Na druhou stranu zbytková populace (zůstatek po oplachu nosiče biofilmu) umožňuje rychlé zotavení systému a rychlost zapracování nosiče se zkracuje.

2.2.8 Měření hustoty komplexu po nárůstu biomasy

Dalším důležitým aspektem při vývoji nosiče (dle kapitoly 1.7.1 v teoretické části práce) je nutnost, aby byla hustota nosiče srovnatelná s daným typem odpadní vody. Na počátku je hustota nanovláknenného nosiče nastavována kombinací polymerů využívaných při výrobě (polypropylen, polyuretan, polyetylen), více je uvedeno v kapitole 2.2.1. Velký důraz je kladen na to, aby byl nosič i po nárůstu biofilmu densitně srovnatelný s odpadní vodou. Cílem testu měření hustoty komplexu (nosič + biofilm) po nárůstu biomasy bylo stanovení, zde bude výše uvedený požadavek splněn či nikoli.

Experimenty měření hustoty komplexu po nárůstu biomasy probíhali v reaktoru dle kapitoly 1.4, specifikace odpadní vody dle kapitoly 1.1.4 (Chloramin B), výsledky ověření nanovláknenných nosičů jsou uvedeny v kapitole 3.4. Na následujících obrázcích je uvedena fotodokumentace experimentu a detail porostlého nosiče.

Výsledky měření hustoty komplexu (nosič + biofilm) po téměř jednom roce kolonizace jsou následující. Nanovláknenný nosič byl podroben zkoušce kolonizace, která trvala téměř jeden rok. Bakteriální populace byla směsná populace z aktivovaného kalu čistírny odpadních vod společnosti Bochemie a.s. Bohumín (potenciálním odběratelem modulové vestavby s nanovláknenným nosičem). Nosič byl testován na reálné průmyslové odpadní vodě této společnosti s obsahem Chloraminu B (specifikace vody dle kapitoly 1.1.4).

Hmotnost mokrého vzorku	= 1 690.1 g/m ²	(bez váhy nosné nitě)
Hmotnost suchého vzorku	= 1 212.6 g/m ²	(bez váhy nosné nitě, nit 1m ² = 213.5 g)
Hustota nosiče	= 909.0 kg/m ³	(celý komplex, biomasa + nosič)
(voda ~ 1000 kg/m ³ , mořská voda ~ 1025 kg/m ³)		



Obrázek 79 – Snímek nosiče biomasy v odměrném válci při testech sedimentace, téměř jeden rok kolonizovaný nosič (detaily nosiče).

Při laboratorních experimentech s aktivovaným kalem (velice dobře a rychle rostoucí bakteriální populací), nebylo během 12ti měsíců trvání experimentu prokázáno žádné extrémní zvýšení hmotnosti celého komplexu (nosič + biofilm). Komplex si stále udržoval densitu srovnatelnou s odpadní vodou. Zvýšení aerace pro udržení komplexu ve vznosu nebylo nutné, komplex se po celou dobu měření pohyboval spolu s danou odpadní vodou, resp. nebylo pozorováno jeho sesedání ke dnu reaktoru.

Kapitola „Měření hustoty komplexu po nárůstu biomasy“ shrnuje základní poznatky ohledně limitních možností kolonizace nanovláčenného nosiče jako nosiče biomasy pro reálné aplikace na čistírnách odpadních vod. Hlavním cílem bylo posouzení, zda je nanovláčenný nosič reálně schopen udržet porůstání biomasy ve velkém množství a jak se nosič v takovém stavu chová. Všechny uvedené výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.

Výsledkem měření je potvrzení vhodnosti nanovláčenného nosiče pro reálné aplikace na čistírnách odpadních vod, jelikož nanovláčka jsou schopna udržet i masivní vrstvy biofilmu, který může produkovat rychle rostoucí aktivovaný kal. V pozdějších stádiích nanovláčka dokonce utvářejí v biofilmu tzv. kostru, která umožňuje zachování plně aktivního biofilmu i pro silnější vrstvy. Celý komplex i po masivním nárůstu biofilmu je densitně srovnatelný s odpadní vodou, což minimalizuje náklady na míchání systému.

2.2.9 Měření bioaktivity biofilmu

Laboratorní respirační testy byly prováděny jako kinetické testy s biomasou fixovanou na nosiči, při stálé laboratorní teplotě. Cílem testů bylo vyjádření specifické respirační rychlosti, která připadá na biomasu fixovanou na nosičích, resp. na biomasu dispergovanou ve vodném roztoku v přítomnosti daného typu nosiče. Záměrem bylo určit aktivitu mikroorganismů na komerčních nosičích a nanovlákných nosičích. Pro testování byla použita reálná průmyslová odpadní voda s obsahem fenolů jako dominantním C-zdrojem (specifikace v kapitole 1.1.3).

Pro stanovení technologických parametrů je rozhodující objemová respirační rychlost, která vyjadřuje spotřebu výsledné náplně bioreaktoru bez nutnosti rozlišovat podíly vlivu jednotlivých složek (respirační aktivita se přepočítá na 1 g biomasy a hodnoty specifické respirační rychlostí slouží jen jako doplňkové informace). Cílem těchto měření je nalézt maximum objemové respirace.

V tabulce níže jsou uvedena data: Pro zhodnocení respirace upoutané i dispergované bakteriální populace bylo využito 30% plnění respirometrické cely s daným nosičem a 70% vody obsahující bakteriální populaci z daného reaktoru (30% nosič NANO + 70% vodaNANO nebo 30% nosič ANOX + 70% vodaANOX). Pro zhodnocení jen dispergované bakteriální populace bylo využito 100% plnění respirometrické cely bakteriální populací z daného reaktoru (100% vodaNANO nebo 100% vodaANOX). Pro zhodnocení jen imobilizované bakteriální populace bylo využito 30% plnění respirometrické cely doplněné 70 % objemu destilovanou vodou dorovnanou na stejnou salinitu (resp. měrnou elektrickou vodivost), kterou měl daný reaktor (30% NANO (+DV) nebo 30% NANO (+DV)).

Tabulka 7 – Hodnocení respirace při testech bioaktivity biofilmu

Podmínky experimentu	X	$r_{V, H, \max}$	$r_{X, H, \max}$
	[g/l]	[g/(l.hod)]	[g/(g.hod)]
30% nosič NANO + 70% vodaNANO	20.09	762.55	37.95
30% nosič ANOX + 70% vodaANOX	11.52	360.00	31.25
100% vodaNANO	19.50	281.93	14.46
100% vodaANOX	10.75	138.90	12.92
30% NANO (+DV)	0.59	480.61	809.66
30% ANOX (+DV)	0.77	221.10	286.84

Z naměřených hodnot je zřejmé, že objemová respirace nejrychleji probíhala při testech s biomasou fixovanou na nanovlákných nosičích, téměř dvakrát rychleji než při testu s nosiči AnoxKaldnes. Z výsledků je patrné zvýšení objemové respirační rychlosti u testů vodného média s nosiči. Je zřejmé, že hodnota maximální objemové respirační rychlosti značně vzrostla pro test s přidáním nanovláken. Při hodnocení specifické respirační rychlosti je potvrzena vhodnost nanovlákných nosičů. Samostatné nanovlákné nosiče dosahují dokonce až téměř třikrát vyšší specifické respirace oproti komerčnímu nosiči AnoxKaldnes.

Kapitola „Měření bioaktivity biofilmu“ shrnuje základní poznatky ohledně výhod nanovláknenného nosiče v oblasti podpory růstu a aktivity vznikajícího biofilmu. Všechny zde uvedené výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce. Jelikož dané měření bylo také předmětem řešení projektu BioCar (Modifikované nosiče biomasy pro čištění odpadních vod, TA01021764, TA ČR – program ALFA, 1/2011 – 6/2014), podílel se na měření také Ing. Tomáš Dub.

Hlavním závěrem měření je rychlejší objemová i specifická respirace biomasy fixované na nanovláknenných nosičích (dokonce až více jak dvakrát rychlejší) oproti respiraci s komerčními nosiči AnoxKaldnes.

3. OVĚŘENÍ NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE NA REÁLNÝCH ODPADNÍCH VODÁCH

3.1. Porovnání fluidních a fixních nanovláknenných nosičů biomasy

Cílem předkládané disertační práce bylo vyvinout konkurenčně schopný nanovláknenný nosič biomasy. Nanovláknenný nosič jako určující prvek při čištění odpadních vod byl popsán v kapitole 2.1. Charakterizace nanovláknenného nosiče (vývoj nanovláknenné nitě, návrh a vývoj fixních a fluidních nosičů), stejně tak jako základní testy nosiče (dezintegrace nanovláken, toxicita, hodnocení kolonizace a další) byly popsány v kapitole 2.2.1. a v kapitolách následujících.

V následujících několika kapitolách je hlavním cílem práce reálné ověření vyvinutého nanovláknenného nosiče (resp. porovnání účinnosti čištění s komerčním nosičem), a to na reálných a modelových odpadních vodách. Ověřování nanovláknenného nosiče probíhá ve formě fluidních i fixních forem nosiče.

a) Fixní nosiče biomasy

Pro experiment byla zvolena pletenina dle specifikace v kapitole 2.2.1 b (obrázek 43), která byla svinuta a zafixována v reaktoru. Laboratorně byly ověřeny tři realizace této pleteniny, rozdíl byl v množství pleteniny, která byla do reaktoru umístěna – jiný specifický povrch pro každý bioreaktor.

- Pro reaktor I. byl použit pás pleteniny s měrným povrchem 405 cm^2 .
- Pro reaktor II. pletenina o měrném povrchu 607.5 cm^2 .
- Pro reaktor III. měla pletenina měrný povrch 810 cm^2 .



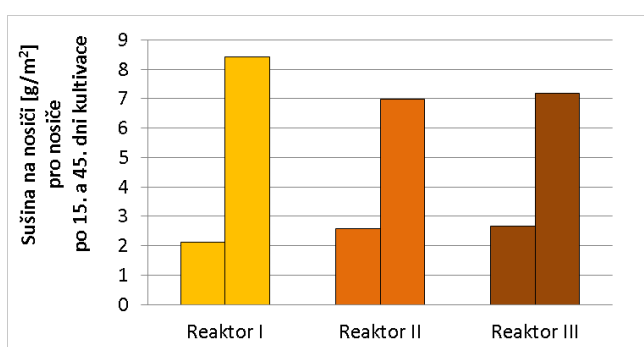
Obrázek 80 – Sestavení laboratorních reaktorů s fixními nosiči biomasy

Pro fixní nosiče byly použity skleněné válcové nádoby o objemu jeden litr. Ostatní parametry reaktoru jsou shodné dle kapitoly 1.4. Do fixních reaktorů byla přidávána modelová voda (dle kapitoly 1.1.3 b) ve formě koncentráту fenolu. Pravidelně každé tři až čtyři dny byl dávkován koncentrát tak, aby finální koncentrace fenolu činila 1000 mg/l . Další dávkování proběhlo vždy až po kompletní degradaci předchozí dávky. Současně s dávkováním fenolu byla odebírána voda z reaktoru a nahrazována odstátou vodovodní vodou (stejně salinity, resp. shodné měrné elektrické

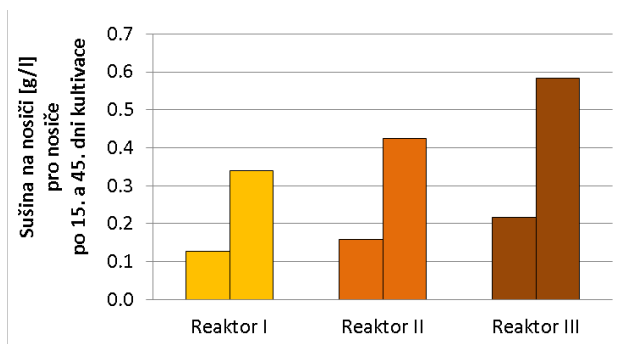
vodivosti), aby byla udržována absorpance disperzní populace v určitém rozmezí a zároveň aby docházelo k výměně reakční směsi. Dvakrát týdně bylo odebíráno 100 ml (pro dané reaktory činila doba zdržení 10 dnů). Vysoká doba zdržení směsi v reaktoru byla volena záměrně, aby v krátké době došlo k rychlému nárůstu bakteriální populace a bylo možné měření respiračních testů. Charakterizace zatížení reaktorů modelovou vodou a další měřené charakteristiky lze najít v Příloze C.

1. Měření sušiny

Sloupcový graf níže zobrazuje vyhodnocení sušiny vázané na nosič v 15. a 45. den experimentu. Největší množství sušiny bylo zpočátku naměřeno na nosiči s nejvyšším specifickým povrchem (reaktor III). Avšak po 45. dni kolonizace překvapivě nejlépe byl hodnocen reaktor s nejnižším měrným povrchem (reaktor I) – pro stanovení sušiny v gramech na plošný metr. Pro doplnění je zde uveden i graf pro hodnocení g/l.



Obrázek 81 – Sušina vázaných mikroorganismů na fixních nanovláknenných nosičích

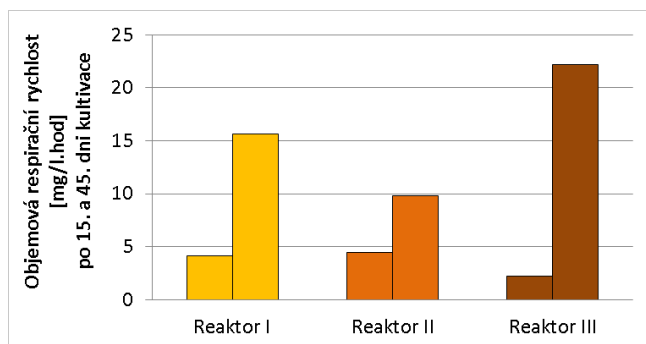


Obrázek 82 – Sušina vázaných mikroorganismů na fixních nanovláknenných nosičích

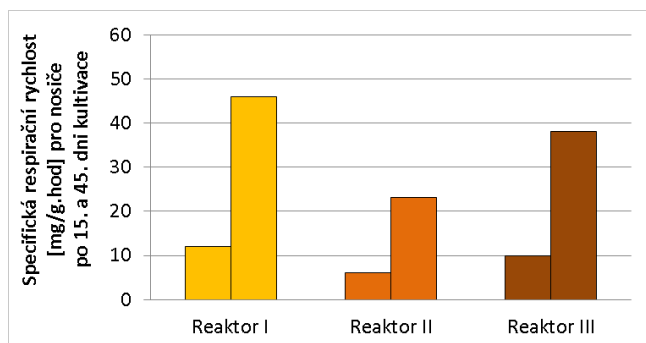
2. Respirace fixních nosičů

V grafu níže jsou uvedeny objemové a specifické respirační rychlosti jednotlivých reaktorů (resp. typů testovaných nosičů pro fixní lože). Pro reaktory byla měřena respirační rychlost v 15. a 45. den provozu. Respirace byla měřena pouze pro fixní nosiče.

Dle grafu níže specifická respirace od 15. dne spuštění reaktoru výrazně vzrostla, ve 45. den provozu vykazuje až čtyřnásobné hodnoty. Hodnoty specifické respirační rychlosti jsou pro fixní lože a pro fluidní nosič „tlustý soudek“ téměř srovnatelné. Tyto výsledky potvrzují vhodnost použití fixního lože a jeho výhody. Hodnoty fluidních nosičů dosahují mírně vyšších hodnot než fixní nosiče, ale je nutné, aby se fluidní nosiče dobře pohybovaly s reakční směsí a nedocházelo k zastavení dmýchacího procesu.



Obrázek 83 – Objemová respirační rychlost (mikroorganismy na nosiči) fixních nanovláknenných nosičů



Obrázek 84 – Specifická respirační rychlost (mikroorganismy na nosiči) fixních nanovláknenných nosičů

b) Fluidní nosiče biomasy

Druhou ověřovanou formou nanovláknenného nosiče, jsou nanovláknenné nitě přetvářené do 3D útvarů, tzv. fluidní nosiče, kde tento typ nosiče proudí společně s odpadní vodou. Cílem testů bylo reálné ověření vytvořených fluidních nosičů. Pro ověřování byly vybrány jen ty typy nosičů, které v kapitole 2.2.1 b) obstály při hodnocení stability nosiče. Pro experiment byly vybrány tři typy fluidních nosičů (obrázek 85 níže) a pro komparaci byl využit komerční nosič AnoxKaldnes (specifikace dle kapitoly 1.7.3 teoretické části práce).



Obrázek 85 – Nosiče zvolené pro laboratorní testování účinnosti čištění odpadní vody (sud tlustý – I. pletenina; sud tenký – II. pletenina; mašle – I. pletenina)

Popis sestavení reaktoru je uveden v kapitole 1.4. Všechny reaktory byly kontinuálně zásobovány shodnou modelovou vodou (doba zdržení činila 10 dnů, 280 ml/den). Modelová voda obsahovala fenol o koncentraci 120 mg/l (postupně až 6000 mg/l). Konduktivita byla udržována v rozsahu 11 – 20 mS/cm. Hodnota pH vstupní vody byla regulována v rozsahu 7 – 7.2. Teplota kolísala mezi 12 – 15 °C

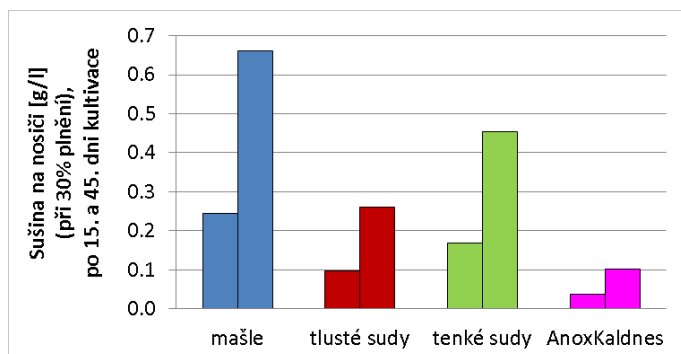
(v důsledku nízké teploty v laboratoři). Charakterizace zatížení reaktorů modelovou vodou a další měřené charakteristiky lze najít v Příloze C.



Obrázek 86 – Sestavení laboratorních reaktorů s fluidními nosiči

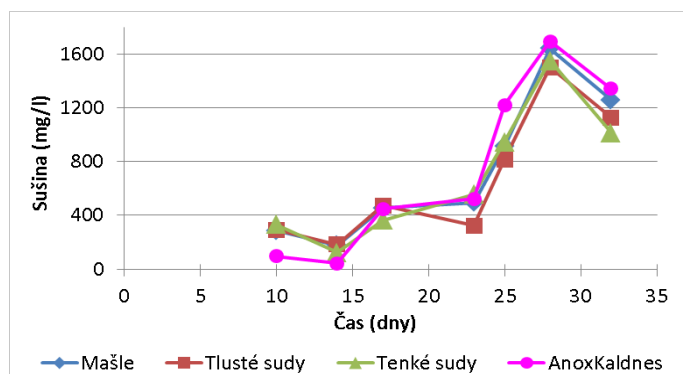
1. Měření sušiny

Nosiče byly na začátku experimentu zcela původní, bez předchozí kolonizace. V grafu níže je ve sloupcovém grafu zachyceno vyhodnocení sušiny v 15. a ve 45. den kolonizace. Nanovláknenné nosiče tvaru mašle dosahovali nejvyšší sušiny (až dvojnásobné hodnoty oproti ostatním nosičům a dokonce více jak 6x více oproti komerčnímu nosiči), a to jak po 15. dni kolonizace, tak po 45. dni kolonizace.



Obrázek 87 – Sušina vázaných mikroorganismů na fluidních nanovláknenných nosičích

Při hodnocení přepočtené sušiny dispergovaných mikroorganismů z CHSK lze vidět, že koncentrace volné biomasy byla ve všech reaktorech shodná. Různá koncentrace upoutané biomasy na nosičích nemůže být způsobena rozdílnou koncentrací biomasy v dispersi.

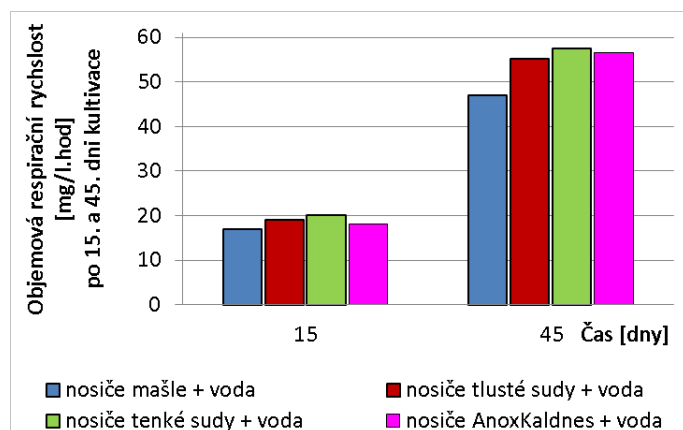


Obrázek 88 – Vyhodnocení sušiny dispergovaných mikroorganismů přepočtem z CHSK

2. Měření respirace fluidních nosičů

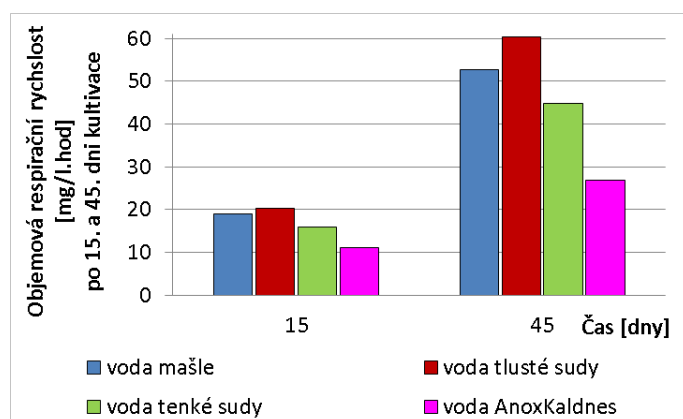
V grafu níže jsou uvedeny objemové respirační rychlosti jednotlivých reaktorů (resp. typů testovaných nosičů pro fluidní lože). Pro reaktory byla měřena respirační rychlost v 15. a 45. den provozu. Respirace byla měřena na třikrát – pro celý reaktor (voda s mikroorganismy + nosiče s biofilmem), jen voda s dispergovanými mikroorganismy, jen nosiče s biofilmem.

Dle grafu níže je uvedena objemová respirace, pro kombinaci nosiče a médium s mikroorganismy (v grafu označeno jako nosič + voda). Respirace od 15. dne spuštění reaktoru výrazně vzrostla, ve 45. den provozu vykazuje až trojnásobné hodnoty. Hodnoty objemové respirace pro nanovláknenné nosiče a pro nosič komerční byly velice blízké.



Obrázek 89 – Objemová respirační rychlost fluidních nanovláknenných nosičů (mikroorganismy na nosiči + voda z daného reaktoru s mikroorganismy).

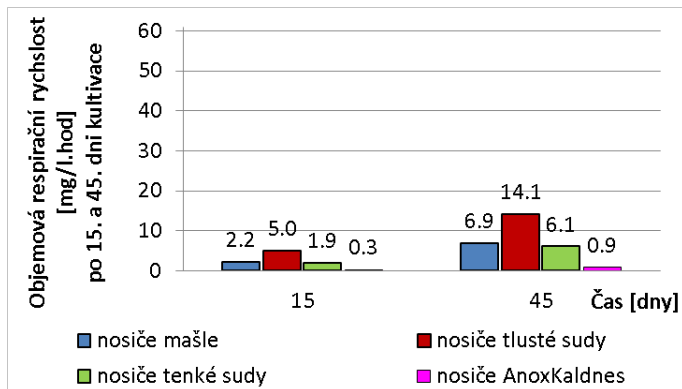
Dle grafu níže objemová respirace samotných dispergovaných mikroorganismů, od 15. dne spuštění reaktoru výrazně vzrostla, ve 45. den provozu vykazuje až trojnásobné hodnoty. Hodnoty objemové respirace jsou pro kombinaci (nosič biomasy + voda) téměř shodné jako objemová respirace samotné vody (tj. dispergovaných mikroorganismů). Dle objemové respirace lze vidět, že nanovláknenné nosiče dosahují vyšších hodnot objemové respirace než komerční nosič (pro 15. den cca. 2x, pro 45. den cca. 1.7x).



Obrázek 90 – Objemová respirační rychlost fluidních nanovláknenných nosičů (voda z daného reaktoru s mikroorganismy).

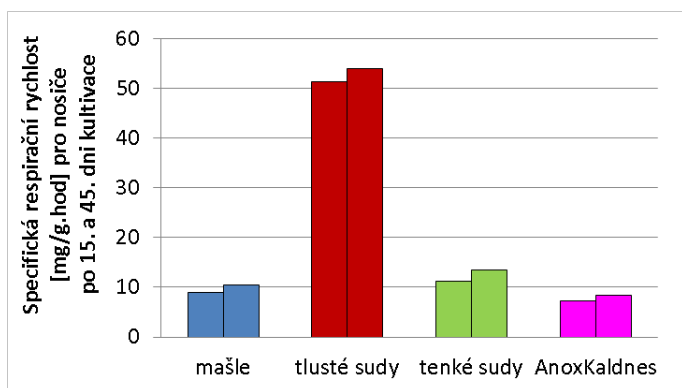
Dle grafu níže objemová respirace mikroorganismů vázaných na nosič, od 15. dne spuštění reaktoru vzrostla, ale nikterak výrazně, pravděpodobně z důvodu velice nízké teploty v reaktoru, což může být

důsledkem pomalejší kolonizace nosičů. Přesto ve 45. den provozu vykazuje respirace trojnásobné hodnoty. Hodnoty objemové respirace jsou pro samotné nosiče cca. 4x až 10x nižší ve srovnání s objemovou respirací (nosič biomasy + voda). Dle objemové respirace lze vidět, že nanovláknenné nosiče dosahují vyšších hodnot objemové respirace než komerční nosič (pro 15. den až 16x (= 5.0 / 0.3), pro 45. den až 16x (= 14.1 / 0.9)).



Obrázek 91 – Objemová respirační rychlost (mikroorganismy na nosiči) fluidních nanovláknenných nosičů

Jelikož byla na nosičích biomasy hodnocena i sušina (viz předešlé hodnocení, bod 1), je možné pro nosiče uvést specifickou respiraci. Dle specifické respirace lze vidět, že nanovláknenné nosiče dosahují vyšších hodnot specifické respirace než komerční nosič (pro 15. den téměř 7x, pro 45. den cca. 6x). Nanovláknenný nosič typu tlustý soudek je oproti nanovláknennému nosiči typu mašle v hodnocení specifické rychlosti lepší cca. 6x, oproti nanovláknennému nosiči typu tenké sudy cca. 4.5x. Hodnoty specifické respirace se pro jednotlivé nosiče příliš neliší, vyjma nanovláknenných nosičů typu „tlusté soudky“.



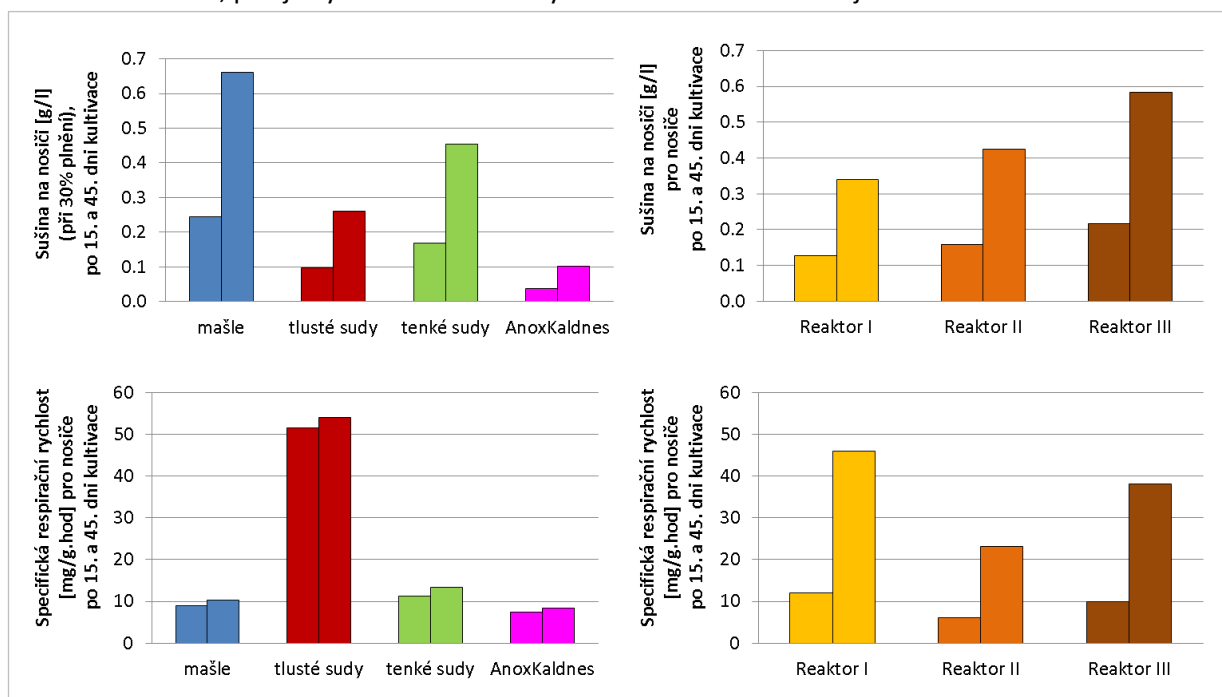
Obrázek 92 – Specifická respirační rychlost (mikroorganismy na nosiči) fluidních nanovláknenných nosičů

Ačkoli nosič „tlustý soudek“ nedosahuje takové míry pokrytí bakteriálním biofilmem jako druhé dva nanovláknenné nosiče, je hodnota specifické respirační rychlosti pro tento typ nosiče nejvyšší. Specifický tvar tohoto nosiče (nanovláknenná vrstva na tlustší podkladové niti a dutý tvar nosiče) umožňuje vytvoření vysoce aktivního biofilmu. Na nosiči typu „mašle“ je sice docíleno vysokého množství biomasy, ale z důvodu možného zarůstání nosiče v jeho středu (možnost vzniku anaerobních zón) jsou bakterie zde usídle k povrchu časem méně aktivní. Fluidní nosič typu „tlusté soudky“ dobře udržuje tvar (*kapitola 2.2.1 c*) a navíc vhodná aerace umožňuje jejich lepší vznášení společně s modelovou vodou. Díky dobrému promíchávání reakční směsi a díky specifickému tvaru samotného nosiče je docíleno vyšších hodnot specifické respirační rychlosti.

Jako nejvhodnější fluidní nosič byl stanoven nosič typu „tlustý soudek“, který dosahoval nejvyšší specifické respirační rychlosti a navíc se jedná o vysoce stabilní strukturu, která bude velice dobře schopna odolávat vyššímu mechanickému namáhání při praktických aplikacích. Bylo prokázáno, že tvar nosiče a jeho vlastnosti mají výrazný vliv na možnosti biologického čištění, především při hodnocení specifické respirační rychlosti.

Cílem experimentu bylo ověřit navržené a vytvořené nosiče biomasy s nanovlákněným pokryvem (fluidní a fixní nosiče). Za tímto účelem byla provozována sada bioreaktorů a sledovány byly jejich chemické parametry. Jako nejvhodnější fixní nosič byl stanoven nosič, který byl umístěn v reaktoru I. o hodnotách „405 cm²/l“, který sice při hodnocení sušiny obsahoval nejnížší množství, ale na druhé straně dosahoval nejvyšší specifické respirační rychlosti (porovnání v grafech níže).

Z grafů porovnání (viz níže) lze jednoduše vypočítat, že jak fluidní tak fixní nanovlákněné nosiče dosahují vyšší sušiny imobilizované na nosiči oproti nosiči komerčnímu (výsledky potvrzuje také hodnocení kolonizace v kapitole 2.2.7). Dle porovnání specifické respirační rychlosti fluidních a fixních nosičů lze vypočítat, že nejlépe hodnocený nanovlákněný fluidní nosič dosahuje mírně lepších hodnot než nanovlákněný nosič fixní (cca. 1.2x = 54.12 / 46.03). Pokud při reálné aplikaci na ČOV nedojde v reaktoru například k mechanické nebo aerační limitaci, pak je pro reálné aplikace výhodnější využití fluidních nosičů. Ovšem pokud by na reálné ČOV kurčným typům limitace docházet mohlo, pak je využití nanovlákněných fixních nosičů vhodnější volbou.



Obrázek 93 – Grafy porovnání fluidních a fixních nosičů (sušina, specifická respirace)

Kapitola „Porovnání fluidních a fixních nanovlákněných nosičů biomasy“ shrnuje základní poznatky z praktického ověření nosičů biomasy při biologickém čištění reálných a modelových odpadních vod. Výsledky kapitoly byly založeny na základě společného měření se studentkou Dominikou Kortusovou, na základě čehož vzešel společný článek:

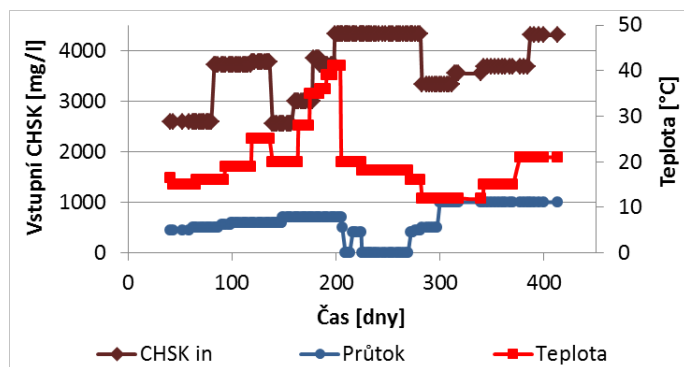
KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., DUB, T., KORTUSOVÁ D., LEDERER T.: *Vývoj alternativních nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod*. Vodní hospodářství 2013, 63 (5), 151–155.

(recenzovaný časopis).

Hlavním závěrem práce byla identifikace ideálního uskupení fluidního nosiče, kterým byl nosič typu „tlustý soudek“. Tato vysoce stabilní struktura schopná odolávat vysokému mechanickému namáhání dosahovala nejvyšší specifické respirační rychlosti. Jako nejvhodnější fixní nosič byl stanoven nosič o hodnotách „400 cm²/l“, který dosahoval nejvyšší specifické respirační rychlosti. Bylo prokázáno, že tvar nosiče a jeho vlastnosti mají výrazný vliv na možnosti biologického čištění, především při hodnocení specifické respirační rychlosti.

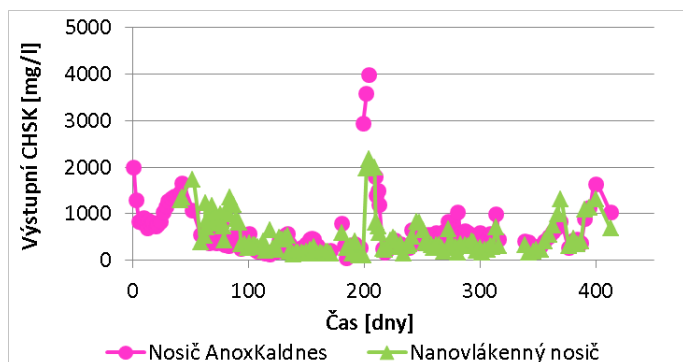
3.2. Anilin, kyanidy a DPG

Cílem laboratorních testů bylo ověření možných hraničních podmínek a limitů technologických parametrů reálné čistírny. Jednalo se zejména o parametry, které negativně ovlivňují a narušují chod čištění s dlouhodobými následky. Vstupními parametry byl průtok vody (resp. doba zdržení), CHSK přítokové vody a teplota. Ověřování nosičů probíhalo v laboratorních podmínkách více než rok. Vyvíjený nanovláknenný nosič byl porovnáván s komerčním nosičem AnoxKaldnes (popsáno v kapitole 1.7.3 teoretické části práce). Specifikace testované vody je uvedena v kapitole 1.1.2 a. Průměrná hodnota CHSK přiváděné surové vody byla 3600 mg/l, salinita vstupní vody (resp. měrná elektrická vodivost) neklesla pod 40 mS/cm. Obrázky níže zachycují vstupní data a výstupní účinnost degračního procesu v závislosti na teplotě a době zdržení.



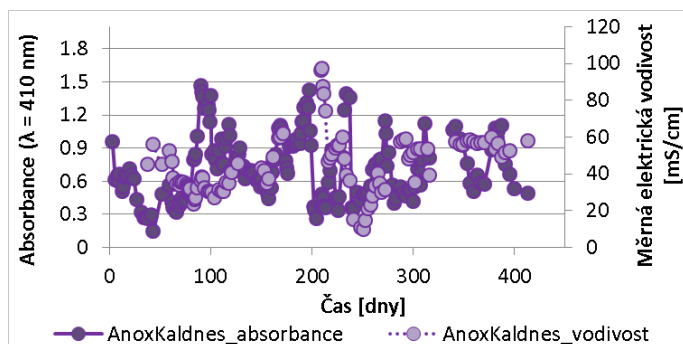
Obrázek 94 – Vstupní (nastavované) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené anilinem

Minimální ověřovaná teplota byla 10 °C, která v rámci biologického čištění nezpůsobila žádné větší problémy. Účinnost procesu při této teplotě byla pro nosič AnoxKaldnes 82 %, pro nosič nanovláknenný 92 %, při době zdržení 48 hodin. Maximální doporučená teplota, při které lze daný reaktor provozovat je 40 °C, kdy účinnost procesu pro nosič AnoxKaldnes byla 9 %, pro nosič nanovláknenný 50 %, při době zdržení 64 hodin.

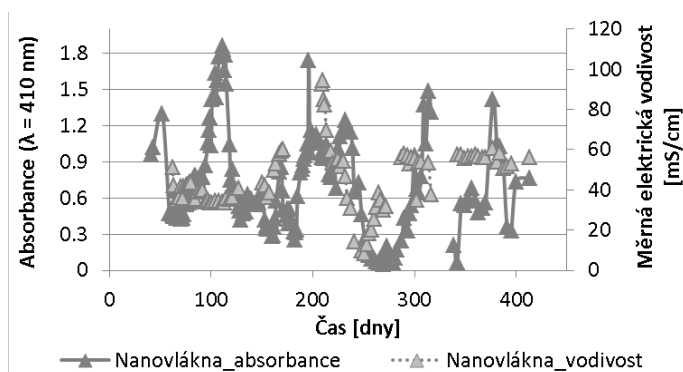


Obrázek 95 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené anilinem

Rychlost biologického čištění se zpomalovala s klesající teplotou, příliš vysoká teplota byla pro mikroorganismy inhibiční. Vyšší teplota je nežádoucí zejména tam, kde může docházet k vypařování vody a tím k zahušťování kultivačního prostředí, což vede k nárůstu salinity (měrné elektrické vodivosti) nebo k nárůstu koncentrace polutantů. S rostoucí teplotou a salinitou odpadní vody klesá rozpustnost kyslíku. Růst nebo pokles teploty o 1 °C způsobil v reaktoru změnu měrné elektrické vodivosti o 2 %. V ověřovaném rozmezí teplot, lze očekávat nárůst měrné elektrické vodivosti (salinity) až o 60 %.

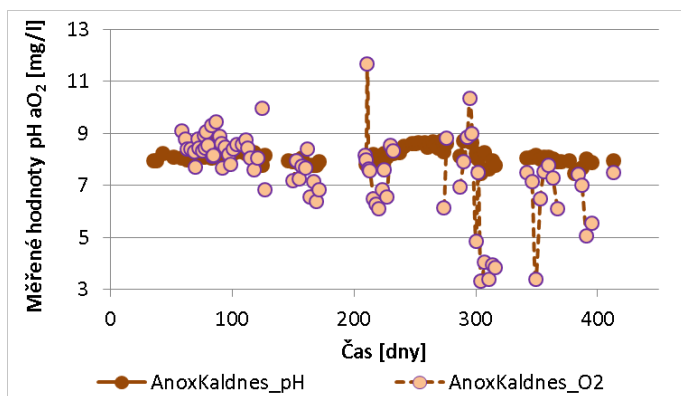


Obrázek 96 – Výstupní parametry reaktoru AnoxKaldnes – absorbance, měrná elektrická vodivost (reálné odpadní vody zatížené fenolem)

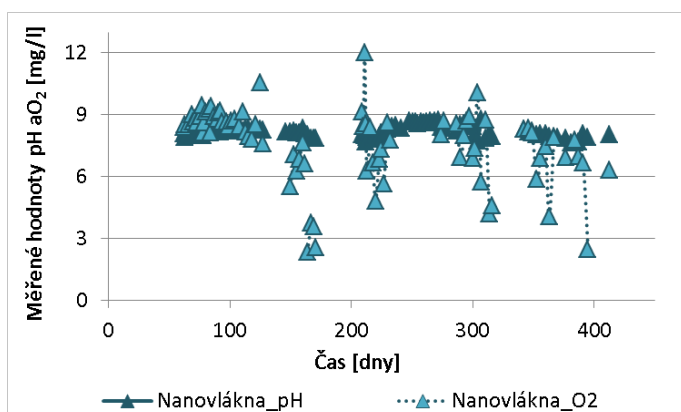


Obrázek 97 – Výstupní parametry nanovláknenného reaktoru – absorbance, měrná elektrická vodivost (reálné odpadní vody zatížené fenolem)

Pro bioreaktor je vhodné zajistit co největší součinitel přestupu kyslíku, a to správnou konstrukcí a umístěním aerátorů, tvarem distributoru vzduchu, velikostí vzduchových bublin atd. Rapidní změny pH o 1 či 2 jednotky mohou silně inhibovat mikrobiální aktivitu. Vzhledem k možnosti unikání kyanidů je nutné udržovat pH v oblasti neutrální či lehce zásadité.

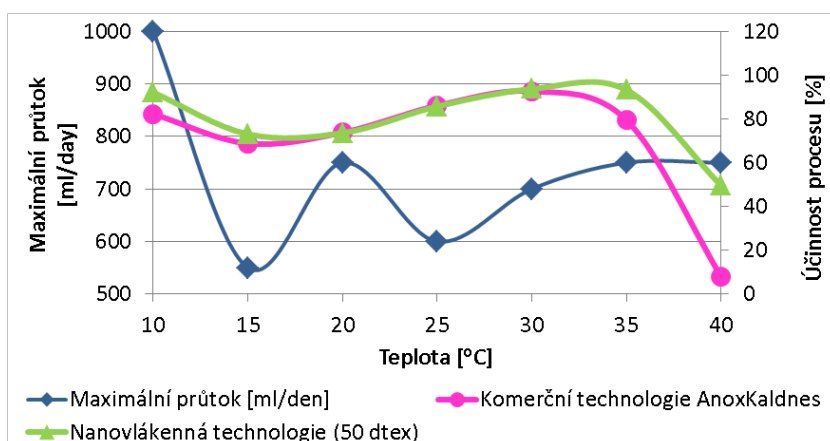


Obrázek 98 – Výstupní parametry AnoxKaldnes reaktoru – pH, rozpuštěný O₂ (reálné odpadní vody zatížené fenolem)



Obrázek 99 – Výstupní parametry nanovláknenného reaktoru – pH, rozpuštěný O₂ (reálné odpadní vody zatížené fenolem)

Nosič na bázi nanovláken je z hlediska účinnosti odstraňování CHSK výhodnější, a to v průměru o 10 % (při době zdržení 48 hodin a teplotě 10 °C) a až o 42 % (při době zdržení 64 hodin a teplotě 40 °C). Především v hraničních stavech reaktoru se skrývá velký potenciál pro využití nanovláknenných nosičů. Mimo jiné nedochází k rapidním výkyvům v efektivitě čištění odpadní vody.



Obrázek 100 – Závislost účinnosti čištění odpadní vody na průtoku a teplotě (reálné odpadní vody zatížené anilinem)

Čas zapracování pro nosič AnoxKaldnes je 93 dnů, pro nanovláknenný nosič 41 dnů. Imobilizované mikroorganismy vykazují vyšší odolnost za použití nanovláknenných nosičů. Nanovláknenný nosič

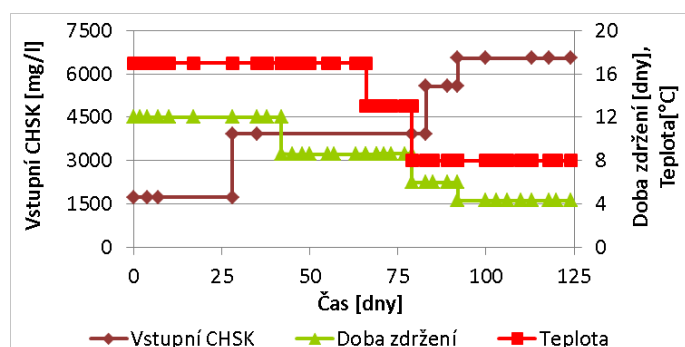
umožňuje rychlejší zapracování nosiče, a tím zkrácení potřebné doby kultivace nebo rychlejší regeneraci po mimořádných stavech. Nanovlákná umožňují daleko vyšší resistenci imobilizovaných bakterií vůči okolním podmínkám v přítomnosti nanovrstev. Kvalita odtoku splňovala požadované nároky v širokém rozsahu rozhodných technologických parametrů.

Kapitola „Ověření nanovláknenného nosiče na reálných vodách obsahujících kyanidy, anilin a DPG“ shrnuje základní poznatky z praktického ověření nosičů biomasy při biologickém čištění reálných odpadních vod. Výsledky této kapitoly pocházejí již z diplomové práce autorky této disertační práce („Technologický návrh biofilmového reaktoru s nanovláknenným nosičem pro čištění průmyslových odpadních vod“).

Hlavním závěrem práce je potvrzení vhodnosti nanovláknenných nosičů při aplikacích na čistírnách odpadních vod. Nosič na bázi nanovláken je z hlediska účinnosti odstraňování CHSK výhodnější dokonce až o 42 % (při extrémním zatížení). Čas zapracování nanovláknenných nosičů je poloviční oproti komerčnímu nosiči. Nanovláknenný nosič umožňuje rychlejší zapracování nosiče, a tím zkrácení potřebné doby kultivace a rychlejší regeneraci po mimořádných stavech. Nanovlákná umožňují daleko vyšší resistenci imobilizovaných bakterií vůči okolním podmínkám.

3.3. Fenoly, kresoly

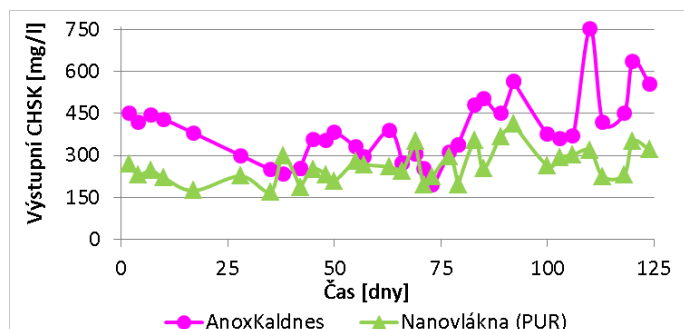
Další testování vyvíjeného nosiče probíhalo na reálných odpadních vodách s vysokým obsahem fenolů, kresolů a dimethylfenolů (specifikace odpadní vody v kapitole 1.1.3 a). Cílem experimentů bylo ověřit možné hraniční podmínky a limity nanovláknenných nosičů pro daný typ odpadní vody. Grafy níže vykreslují vstupní parametry (CHSK testované vody, doba zdržení a teplota) a výstupní parametry pro oba porovnávané nosiče (komerční a nanovláknenný).



Obrázek 101 – Vstupní (nastavované) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené fenolem

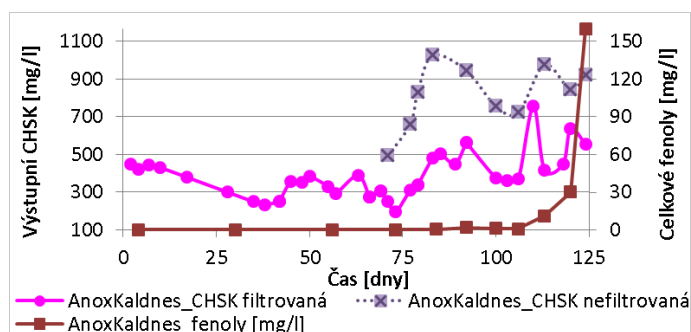
Na počátku experimentu (před zapracováním nosiče) a v závěru experimentu (při nejvyšším zatížení bioreaktorů, kdy byla teplota a doba zdržení minimální) byl rozdíl porovnávaných nosičů v hodnocení účinnosti odstraňování kontaminace výrazný, a to ve prospěch nanovláknenného nosiče. Použití nanovláknenného nosiče dosahuje lepších výsledků především při zapracování reaktoru a v extrémních

stavech systému (teplota, průtok, salinita), kde pro jiné nosiče degradace již selhává. V přítomnosti nanovláknenného nosiče navíc nenastávají oscilace ani žádné výraznější výkyvy účinnosti.

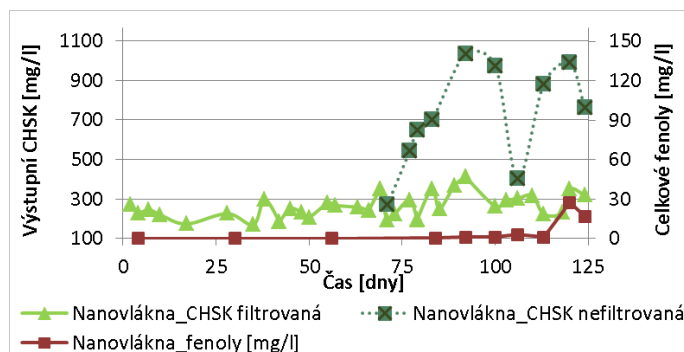


Obrázek 102 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené fenolem

Mnohem lépe prokážeme pozitivní výsledky pro využití nanovláknenného nosiče, podíváme-li se na grafy níže. Hodnoty filtrované a nefiltrované CHSK jsou opět velice identické, ovšem parametr „celkové fenoly“ již vykazuje výrazný rozdíl. Finálně celkové fenoly (metodika dle kapitoly 1.1.1) pro nosič AnoxKaldnes dosahují až k hodnotě 160 mg/l, pro nanovláknenný nosič jen k hodnotě 30 mg/l. Důvod „kolapsu“ systému pro nosič AnoxKaldnes v závěru experimentu může být způsoben synergickým efektem působení nízké teploty (8 °C), nízké doby zdržení (4 dny) a vysokého látkového zatížení (6 550 mg/l).



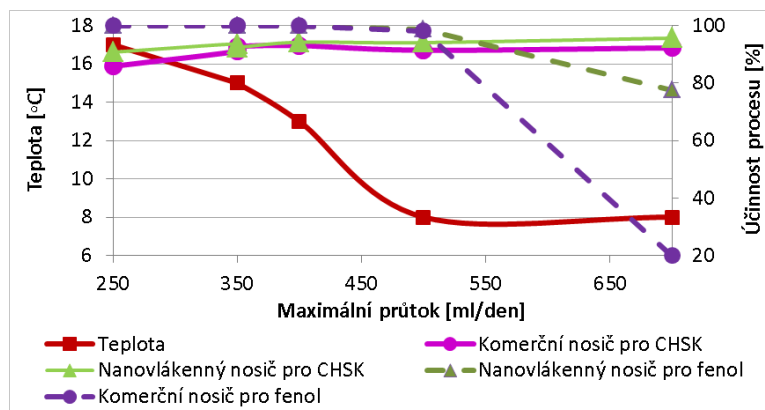
Obrázek 103 – Výstupní parametry reaktoru nosiče AnoxKaldnes – CHSK, celkové fenoly (reálné odpadní vody zatížené fenolem)



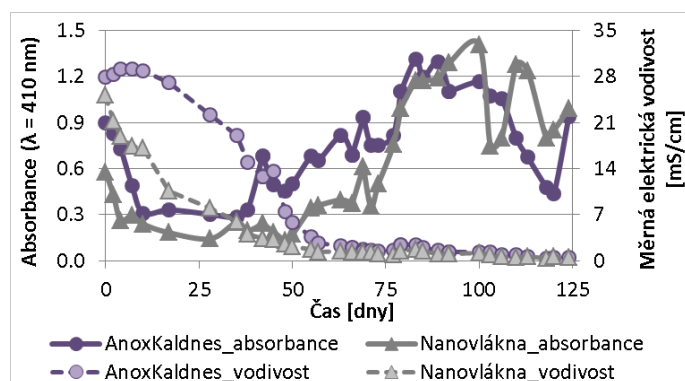
Obrázek 104 – Výstupní parametry reaktoru s nanovláknenným nosičem – CHSK, celkové fenoly (reálné odpadní vody zatížené fenolem)

Hlavním výsledkem měření je, že nosič na bázi nanovláken byl z hlediska účinnosti odstraňování CHSK výhodnější v průměru o 5 % a v porovnání účinnosti odstraňování celkových fenolů až o 50 % (obě hodnoty při době zdržení 4.5 dne). Přítomnost nanovláknenného nosiče v reaktoru umožňuje zvýšení

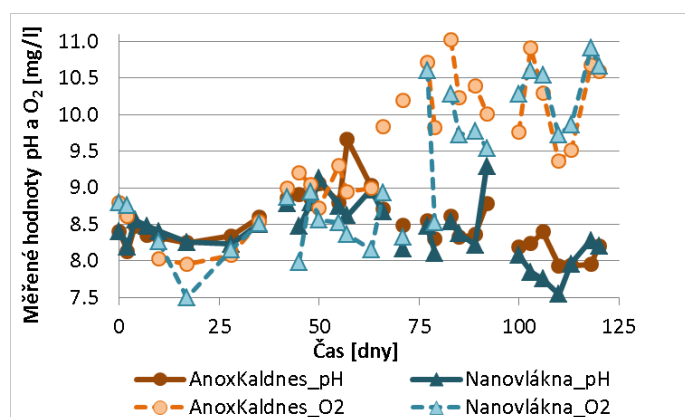
odolnosti systému proti vyšším teplotám, vyšší salinitě i vyšší koncentraci polutantů. Čas zapracování nosiče je pro nosič AnoxKaldnes 38 dnů, pro nanovláknenný nosič 17 dnů.



Obrázek 105 – Závislost účinnosti čištění odpadní vody na průtoku a teplotě (reálné odpadní vody zatížené fenolem)



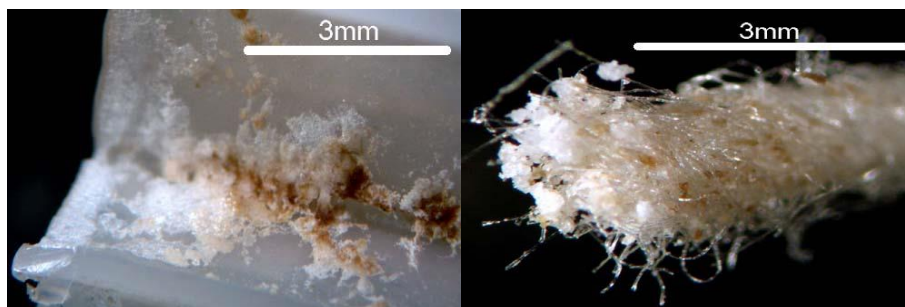
Obrázek 106 – Výstupní parametry reaktorů – absorbance a měrná elektrická vodivost (reálné odpadní vody zatížené fenolem)



Obrázek 107 – Výstupní parametry reaktorů – pH a rozpuštěný kyslík (reálné odpadní vody zatížené fenolem)

Dále byly měřeny parametry absorbance, pH, rozpuštěný kyslík (uvedeno na obrázcích výše). Absorbance téměř kopírovala průběh vstupní CHSK, vyjma počátku kde docházelo k vysokému úniku mikroorganismů, pravděpodobně z důvodu nedostatku potřebného C-zdroje); a také vyjma závěru testu kde synergický efekt všech vstupních parametrů byl značný. Hodnoty pH v bioreaktorech bylo nutné uměle udržovat přidávkou NaOH, případně HCl na hodnotě kolem pH 8. Kolísání v hodnotách rozpuštěného kyslíku bylo pravděpodobně způsobeno změnami teploty a salinity.

Jelikož soli jsou typické vysokou adhezí k povrchu nosiče, vytváří se ihned po aplikaci nosiče do reaktoru vysoká míra solných inkrustů na jeho povrchu, což velice ovlivňuje počáteční kolonizaci mikroorganismů. Teprve až na solných vrstvách se již vyskytují mikroorganismy (mikroorganismy mají vyšší adhezi k soli než k povrchu nosiče), až poté se mikroorganismy rozšiřují dále na povrch nosiče (viz *obrázek 108*). Z tohoto důvodu je výhodnější užití nanovláknenného nosiče, kde mikroorganismy kolonizují přímo nanovrstvy. V přítomnosti nanovláknenného nosiče navíc nedochází k vytváření solných inkrustů na povrchu nosiče (nebo jen k velice omezené tvorbě na koncích nitě).



Obrázek 108 – Tvorba solných inkrust na nosiči AnoxKaldnes a na nanovláknenném nosiči (pro reálné odpadní vody zatížené fenolem)

Při měření objemové a specifické respirace bylo do respirometrické cely vloženo 41 nosičů AnoxKaldnes a 112 nití s nanovláknem o celkové délce 22.4 metrů (sytný objem obou nosičů byl zachován a činil 30 % objemu nádoby). Do příslušné respirometrické cely byl, či nebyl přidán daný typ dispergované bakteriální suspenze, měřena byla respirace kombinace nosič + suspenze (30% nosič NANO + 70% suspenze NANO); jen nosič (30% NANO (+DV)) který byl vložen do destilované vody o stejné měrné vodivosti jako dané médium v reaktoru; jen suspenze (v tabulce označeno jako 100% suspenze).

Tabulka 8 – Hodnoty nerozpuštěných látek (113. den provozu, reálné odpadní vody zatížené fenolem)

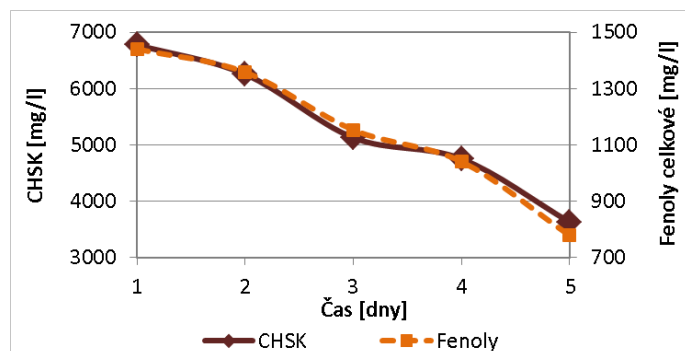
Voda	objem vody [ml]	průměr NL ve vodě [g]	celkové NL ve vodě
ANOX	20	0.2150	10.75
NANO	20	0.3900	19.50
Nosiče	počet nosičů	průměr sušiny	celková sušina
ANOX	41	0.0188	0.7700
NANO	112 nití (22.4 m)	0.0053	0.5936

Pro stanovení technologických parametrů je rozhodující objemová respirační rychlost, která vyjadřuje spotřebu výsledné náplně bioreaktoru bez nutnosti rozlišovat podíly vlivu jednotlivých složek. Sledujeme, jak se chová náplň bioreaktoru jako celek, a nerozlišujeme, co způsobuje pouze biomasa na nosiči. Odpadní vody v experimentech obsahovaly vysokou dávku nerozpuštěných látek. Z důvodu zatížení odpadní vody nerozpuštěnými látkami dosahují respirace nízkých rychlostí, protože obsah aktivní biomasy ve stanovované sušině je nízký. Cílem měření bylo nalézt maximum objemové respirace. Z naměřených hodnot je zřejmé, že respirace nejrychleji probíhala při testech s biomasou fixovanou na nanovláknenných nosičích, téměř dvakrát rychleji než při testu s nosiči AnoxKaldnes. Z výsledků je patrné zvýšení respirační rychlosti u testů média s nosiči.

Tabulka 9 – Vypočtené respirační rychlosti (reálné odpadní vody zatížené fenolem)

Podmínky experimentu (plnění reaktoru)	X [g/l]	rV, H, max [mg/(l.hod)]
30% nosič NANO + 70% suspenze NANO	20.09	762.55
30% nosič ANOX + 70% suspenze ANOX	11.52	360.00
30% NANO (+DV)	0.59	480.61
30% ANOX (+DV)	0.77	221.10
100% suspenze NANO	19.50	281.93
100% suspenze ANOX	10.75	138.90

Aerací systému se zvyšuje možnost odparu těkavých látek (dochází k odstranění látek ze systému před jejich degradací). Proces těkání je značně ovlivněn teplotou (při experimentu byla teplota 22 °C). Modelová situace těkání je zobrazena na grafu níže. Při kontinuální kultivaci v laboratorním experimentu se doba zdržení postupně snižuje z 12 až na 4.2 dní. Z grafu níže je patrná možnost toho, že látky s nízkou teplotou vypařování vytěkají dříve, než dojde k jejich biologickému rozložení. Z tohoto výsledku plyne důvod, proč v závěru experimentu (pro 4 dny zdržení) dochází ke „kolapsu“ systému (dle obrázku 103).

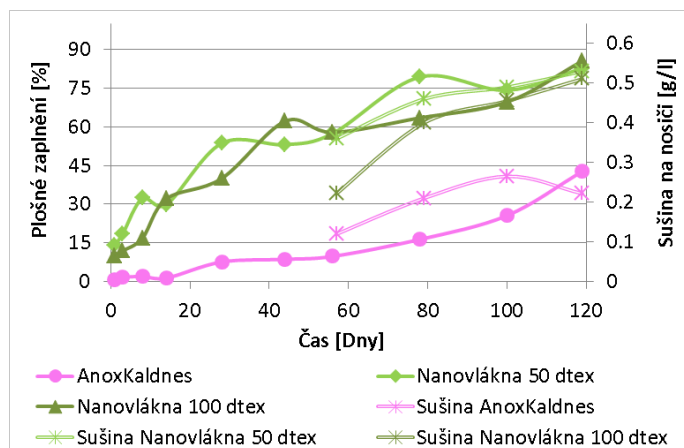


Obrázek 109 – Proces těkání kontaminantů (reálné odpadní vody zatížené fenolem)

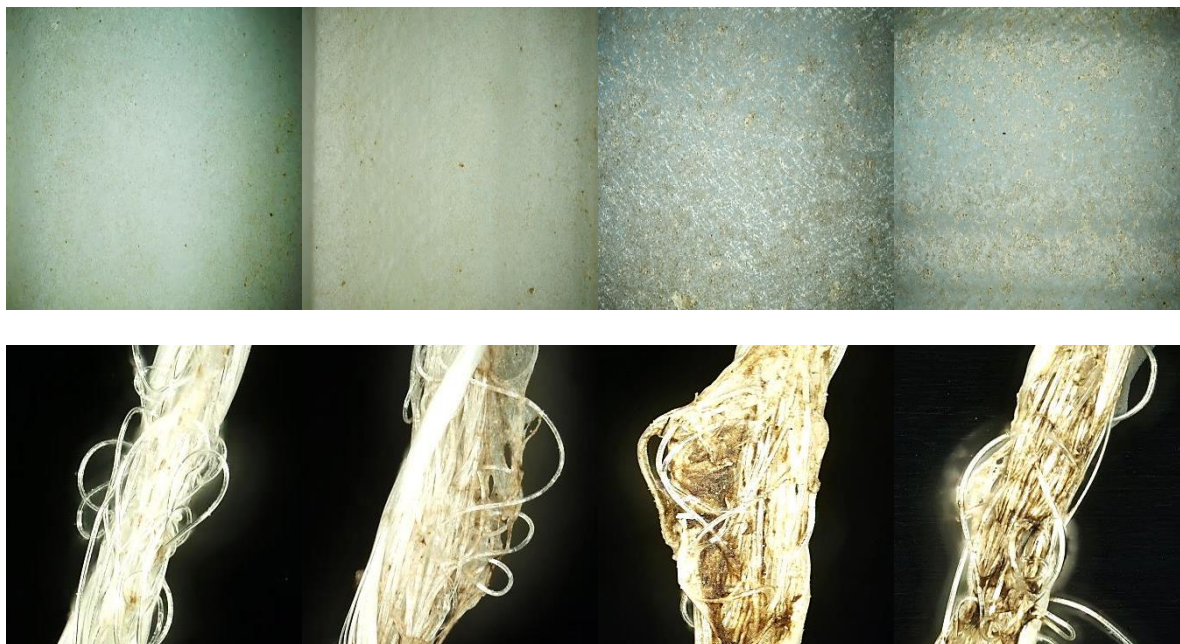
Hydrofobita povrchu je jedním z důležitých faktorů ovlivňujících bakteriální adhezi. Bakterie *Rhodococcus erythropolis*, která má hydrofobní povrch, vykazuje lepší schopnost adheze na hydrofobní materiál, v tomto případě polyuretan. Nastává tak rychlejší kolonizace nanovláknenného nosiče oproti nosiči komerčnímu, k čemuž dopomáhá vysoký měrný povrch díky nano-vrstvám. Další popis kolonizace pro tento experiment je uveden v kapitole 2.2.7. b.

Sušina na nosiči (přepočítáno pro celý bioreaktor) dosahovala pro nanovláknenný nosič v závěru experimentu podobných hodnot jako pro nosič AnoxKaldnes (obrázek 110 níže). Hodnocení sušiny doprovázelo obrazové hodnocení biofilmu (více v kapitole 4). Dále je vysoce pravděpodobné, že faktory usnadňující proces adheze a morfologická struktura povrchu díky nanovláknům mají též pozitivní vliv na fyziologické vlastnosti vzniklého biofilmu, což se následně projevuje účinnější degradací fenolu. Počáteční kolonizace nanovláknenného nosiče je několikanásobně rychlejší a výsledný biofilm je mohutnější a dosahuje vyšších aktivit. Stabilita a plocha aktivního biofilmu může

být vyšší než na běžných nosičích, což přináší současně vyšší účinnost odbourávání znečišťujících látek biologickými metodami.



Obrázek 110 – Sušina a obrazové hodnocení nosičů (pro reálné odpadní vody zatížené fenolem)



Obrázek 111 – Snímky vývoje biofilmu v průběhu experimentu pro AnoxKaldnes a nanovláknenný nosič

Kapitola „Ověření nanovláknenného nosiče pro reálnou a modelovou vodu obsahující fenoly a kresoly“ shrnuje základní poznatky z praktického ověření nosičů biomasy při biologickém čištění reálných odpadních vod. Výsledky kapitoly byly založeny na základě společného měření se studentem Tomášem Dubem, na základě čehož vzešel společný článek:

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., LEDERER T.: *Development of nanofiber support for use as a carrier of bacterial biomass in wastewater treatment*, NANOCON 2012, 23. – 25. 10. 2012, Brno; Sborník bude zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

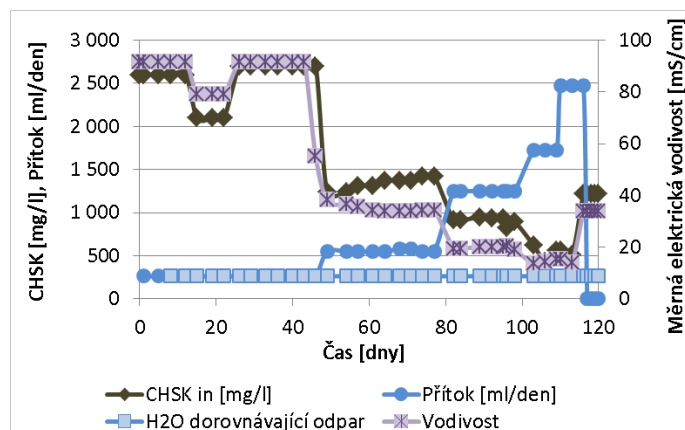
Laboratorní testování ukázalo efektivní čištění odpadních vod zatížených fenolem pomocí nanovláknenných nosičů. Nanovláknina jsou efektivním nosičem bakteriálního biofilmu. Nanovláknenný nosič dosahuje průměrně nižších hodnot celkového zatížení organického znečištění na odtoku. Nanovláknenný nosič má schopnost odolávat významnějším oscilacím v kvalitě odpadních vod, čímž je

možné předcházet opakovanému zapracování bioreaktoru. Počáteční zapracování nanovláknenného nosiče je rychlejší především díky charakteristické morfologii a vysokému měrnému povrchu.

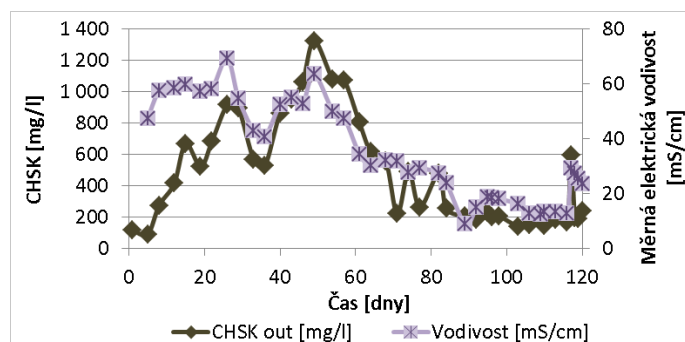
3.4. Chloramin B

Další testování vyvíjeného nanovláknenného nosiče probíhalo na reálných odpadních vodách s vysokým obsahem chloraminu B (specifikace dle kapitoly 1.1.4), CHSK vstupní vody se pohybovalo do 2600 mg/l. Cílem experimentu bylo ověřit možné hraniční podmínky a limity bioreaktoru s využitím nanovláknenného nosiče (zde k porovnání s komerčním nosičem nedošlo). Graf níže vykresluje vstupní parametry (CHSK, přítok odpadní vody a salinitu).

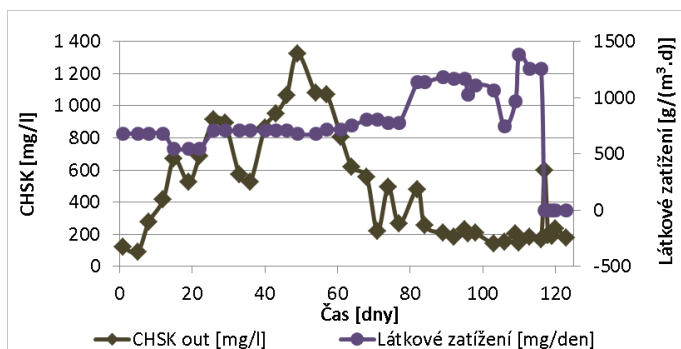
Jelikož docházelo k vysokému odparu vody, bylo nutné pro konstantní objem reakční směsi v reaktoru dorovnávat reaktor vodou. Pro maximální provozní parametry probíhala degradace Chloraminu B vcelku dobře, ale jen po určitou dobu (cca 50 dnů). V průběhu tohoto času se hodnoty výstupní CHSK konstantně zvyšovaly (až k hodnotě 1200 mg/l CHSK, tj. jen 54% účinnost odbourávání vstupní kontaminace). Snížením vstupní CHSK na 1200 mg/l se výstup pozvolna vrátil k hodnotě 200 mg/l CHSK (83 % účinnost degradace). Teplota v reaktoru, pH, ani kyslík se během kultivace výrazně neměnily.



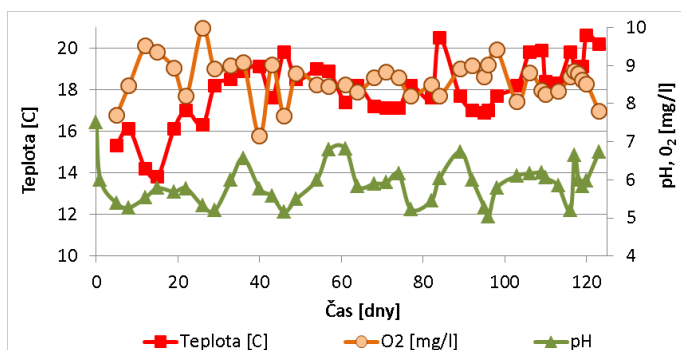
Obrázek 112 – Vstupní (nastavované) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B



Obrázek 113 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B – výstupní CHSK, měrná elektrická vodivost.



Obrázek 114 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B – výstupní CHSK, látkové zatížení.



Obrázek 115 – Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B – teplota, rozpuštěný kyslík, pH.

Hlavním cílem, proč byl test prováděn, bylo využití jiné mikrobiální populace než v předešlých testech. V testu hodnocení degradace Chloraminu B bylo využíváno aktivovaného kalu z reálné biologické čistírny odpadních vod (Bochemie a.s. Bohumín).

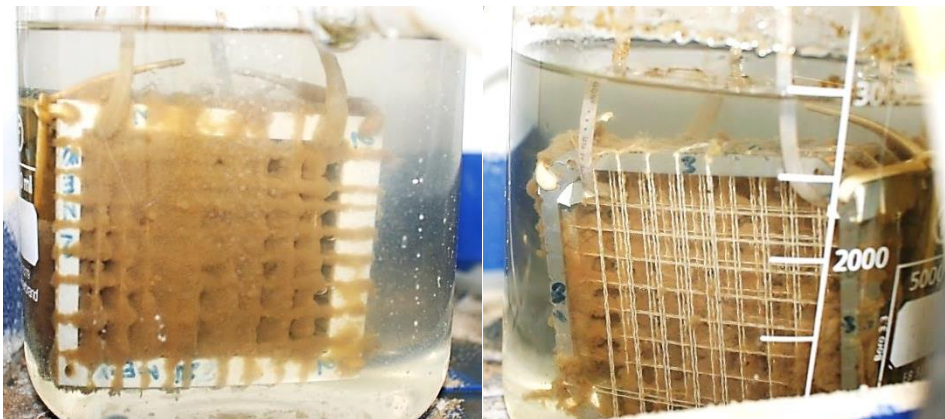
Na snímcích níže je zachyceno, jak biofilm (tvořený aktivovaným kalem) prorůstá (nano)vlákněným nosičem. Nanovláknna tvoří skeleton biofilmu, drží jej pohromadě. Vhodná struktura nanovlákněných nosičů umožňuje dosažení vyšší mohutnosti aktivního biofilmu oproti komerčním nosičům a zároveň je zachována vysoká aktivita celého komplexu (nosič + biofilm) při vysoké účinnosti biologického čištění. V laboratorních experimentech byla prokázána vysoká stabilita celého komplexu, a to i při vysoké koncentraci kontaminantů a při vysokých průtocích, kdy dispergovaná populace ve vodě již zcela vymizela, ale biofilm na nanovlákněných strukturách si zachovával svou vysokou účinnost.



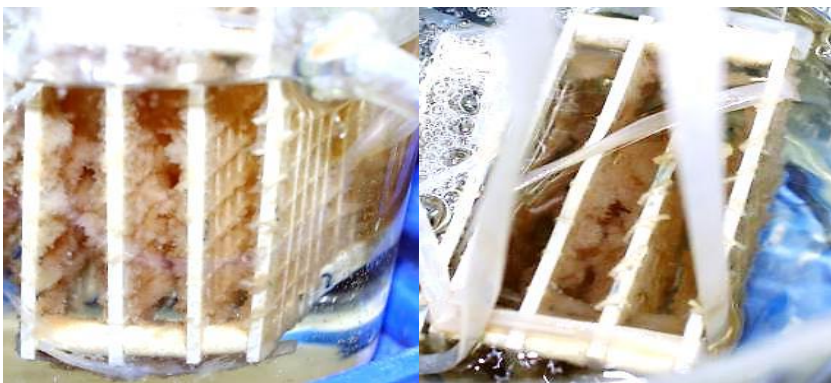
Obrázek 116 – Biofilm na vyjímatelných nosných rámech, detail biofilmu v mokřím a suchém stavu (pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B v laboratorních podmínkách)

V experimentu byl porovnáván vliv nanovlákněné nitě s označením Nános 2 (50 dtex) a Nános 3 (100 dtex). Obrázky níže ukazují, jaký vliv má hustota povrstvení na tvorbu imobilizované biomasy

na nosiči, nižší kolonizace v rámci struktury s hodnotou 100 dtex byla pravděpodobně způsobena vyšší sorpcí chloraminu k tomuto povrchu. Výsledky této kapitoly potvrzují výsledky zjištěné v kapitole 2.2.3.

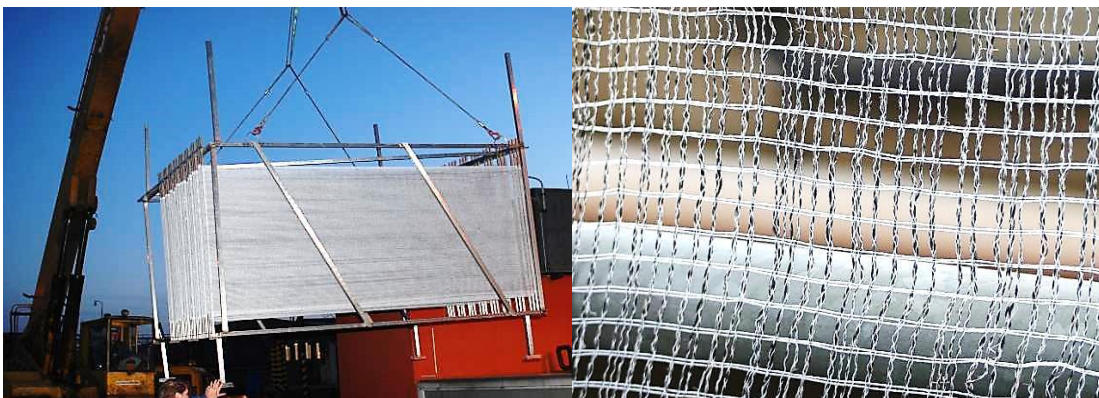


Obrázek 117 – Zachycení poslední fáze kolonizace nosiče, rozdíl mezi použitím nanovlákněných nití typu 50 dtex (vlevo) a 100 dtex (vpravo), pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B.

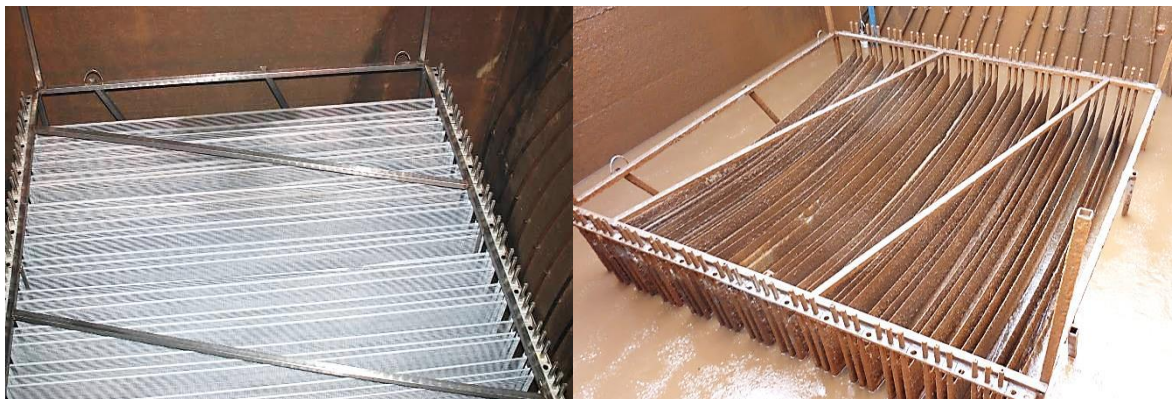


Obrázek 118 – Detail reaktoru (přichycení mikroorganismů na nosičích, vlevo 50 dtex, vpravo 100 dtex) pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B.

Textilní pletenina dle specifikace v kapitole 2.2.1 b byla v rámci fakulty textilní vyrobena v rozsahu cca 130 m². Pletenina byla umístěna do reálné ČOV Bochemie a.s. Bohumín, kde výsledky laboratorního testování dané odpadní vody je uvedeno výše. Snímky z instalace a snímky původní pleteniny a pleteniny po jednom roce kolonizace nosiče jsou uvedeny níže.



Obrázek 119 – a) Reálná aplikace na ČOV Bochemie a.s. Bohumín, technologie vyjímatelných nosných rámců; b) Detail nanovlákněné pleteniny. (Lederer, 2011)



Obrázek 120 – a) Pletenina ihned po aplikaci na ČOV Bochemie a.s. Bohumín, před kolonizací; b) Pletenina po jednom roce běhu čistírny. (Lederer, 2011)

Kapitola „Ověření nanovláknenného nosiče pro reálnou vodu obsahující chloramin“ shrnuje základní poznatky z praktického ověření nosičů biomasy při biologickém čištění reálných odpadních vod. Všechny uvedené výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.

Laboratorní testování ukázalo efektivní čištění odpadních vod zatížených chloraminem pomocí nanovláknenných nosičů. Nanovláknna jsou efektivním nosičem bakteriálního biofilmu tvořeného aktivovaným kalem. Jelikož aktivovaný kal usedal na nanovláknenné struktury velice rychle, byl tím prokázán rozdíl mezi nanovláknennými strukturami 50 dtex a 100 dtex, které byly hodnoceny v kapitole 2.2.3. Rychlejšího zpracování nanovláknenného nosiče je docíleno díky charakteristické morfologii a vysokému měrnému povrchu, v rámci struktury s hodnotou 100 dtex je nižší kolonizace způsobena pravděpodobně vyšší sorpcí chloraminu k tomuto povrchu.

4. OBRAZOVÁ ANALÝZA BIOFILMOVÝCH STRUKTUR

Obrazová analýza se v posledních letech užívá čím dál častěji, přesto povědomí o této nové a progresivní metodě není v biologických vědách příliš rozšířeno. Obecně je možné tohoto přístupu využívat při jakémkoliv hodnocení nasnímaných fotografií v makro i v mikro-měřítku, černobílých i barevných a v jakémkoli oboru lidské činnosti (od strojírenství po biotechnologie).

Analýza obrazu je proces získávání smysluplných informací z obrazu. Které informace jsou důležité, závisí na konkrétní úloze nebo situaci, mohou to být například barvy, textury, velikost či tvar zkoumaných objektů a další. Principem obrazové analýzy je rozpoznat pro člověka zřejmé vizuální rozdíly, například barevného zastoupení (při zanedbání jasu) a detekovat bakteriální biofilm. V detekovaném biofilmu je cílem například charakterizovat parametry struktury biofilmu a kinetiku jeho růstu. Analýza obrazu biofilmu uchycovaného na nosiči v odborné literatuře již existuje (Lewandowski and Beyenal, 2007), ale analýza obrazu biofilmu, který je formován na nanovlákněném nosiči prováděna nebyla (neexistují žádné dostupné zdroje). Dále uvedené výsledky prokázaly zajímavé vlastnosti nanovlákněných nosičů, které předtím nikdy odhaleny nebyly. Tyto vlastnosti byly prakticky doloženy laboratorním hodnocením (viz předešlé kapitoly).

Cílem této kapitoly předkládané disertační práce je návrh procedur automatické obrazové analýzy pro hodnocení charakteristik imobilizovaných biofilmových struktur. V rámci praktické části této disertační práce byl v *kapitole 2* popsán vývoj a výroba nanovlákněného nosič biomasy, byly změřeny jeho charakteristické vlastnosti, včetně hodnocení kolonizace. *Kapitola 3* následně sumarizuje výsledky k testování nanovlákněného nosiče na reálných či modelových odpadních vodách. Pro zde uvedené obrazové hodnocení byly použity fotografie z modelového příkladu z *kapitoly 3.3*, kde dominantním c-zdrojem byl fenol. V průběhu těchto měření bylo získáno velké množství fotografií (snímků bakteriálního biofilmu na nosičích), následně tyto obrazy sloužili jako vstupní data pro tuto kapitolu obrazového hodnocení. Fotografie vzorků byly pořízeny za pomoci soustavy mikroskopu a digitálního fotoaparátu (popis v *kapitole 1.2.4*) a následně byly automaticky analyzovány zde navrženým algoritmem (programovým kódem). Získaná data v podobě morfologických vlastností (porozita, fraktální dimenze apod.) byly porovnávány s výsledky laboratorních měření za účelem nalezení základních souvislostí a vazeb.

Obrazová analýza může v jistých směrech poskytovat dokonce více zajímavých výsledků než standardně užívané metody. Při odhalování souvztažností v mikroměřítku se totiž odkrývají další důležité charakteristiky bakteriálních konsorcií, což pomáhá odhalit další nejasnosti a odkrýt souvislosti, které jinými metodami odhalit nelze. Charakteristika biofilmu a pochopení jeho struktury a vlastností může mít vliv na účinnost biologického čištění, potažmo i celého systému čištění odpadních vod. Velikost buněčných shluků či neobsazeného prostoru na nosiči má spojitost se změnami v populaci a stavu živin (Beyenal et al., 2000), tvar shluků má pak zase spojitost s hydrodynamikou v systému (Lewandowski and Beyenal, 2007; Yang et al., 2000). A právě z těchto důvodů je vhodné ne-li nezbytné tyto buněčné struktury sledovat a vyhodnocovat je vhodnými prostředky.

Velkou předností analýzy obrazu jsou její rychlost, objektivní hodnocení, efektivita při zpracování velkého množství dat a nevyžaduje žádnou větší zkušenost s analytickým postupem. V biologické

praxi je pak výhodou neinvazivní charakter hodnocení, kdy není nutné vzorek jakkoli poškozovat či barvit. Metoda pak umožňuje opětovné použití měřeného vzorku.

Pro přesné hodnocení parametrů objektu v obraze je vhodné jeho hodnocení ve všech třech rozměrech (3D), toto hodnocení s sebou přináší nesporné výhody, na druhou stranu je více časově, matematicky i technicky náročnější. Zjednodušený model plošného hodnocení (2D) je pro pochopení základních vztahů a metodiky dostatečné, především pro úvodní fáze kolonizace (pro tenký biofilm).

Proces tvorby a růstu bakteriálních populací na nosiči je jedním z nejzásadnějších vlivů pro pochopení hodnocení odpoutání biomasy a k pochopení správných procesů biologického čištění vůbec. To podtrhuje nutnost přesného popisu struktury a vývoje biofilmu. (Loosdrecht et al. 1995; Tijhuis et al. 1994a, Lewandowski and Beyenal, 2007). Lepší charakterizace vlastností biofilmu může zlepšit porozumění procesu a upřesnit kvantitativní popis systému. Pro kvantitativní popis nárůstu biofilmu existuje jen omezené množství parametrů, které jsou v současné době k dispozici. (Peyton 1996; Lewandowski and Beyenal, 2007; Yang et al., 2000) Disertační práce se zabývá především hodnocením biofilmových struktur v plošném měřítku a snaží se odhalit charakter tvorby biofilmu na dvou diametrálně různých nosičích, resp. povřích (plastový komerční nosič AnoxKaldnes a nanovláknenný nosič).

4.1. Snímání obrazu

Snímky byly pořizovány systémem, který se skládal z mikroskopu Olympus BX51M (při optickém zvětšení 50×, případně 200×), snímky byly snímány v temném poli, kde zdrojem světla byla rtuťová výbojka. K pořízení obrazu byla využita digitální jednooká zrcadlovka Olympus E-510. Pro získání fotek s vysokou hloubkou ostrosti byl využit komerční software QuickPHOTO MICRO 2.3 s přídavným modulem Deep Focus 3.1 Přesnější specifikace jsou uvedeny v kapitole 1.2.4.

Cílem obrazové analýzy je nejprve obraz rozčlenit na místa zájmu (biofilm) a ostatní (pozadí, nosič). Přirozené zbarvení bakteriálního biofilmu nelze nikterak ovlivnit. První možností jak ovlivnit zbarvení výsledného obrazu, je vhodné nastavení osvětlovací a snímací aparatury. Druhou možností je ovlivnění vlastnosti nosičů (barva, odrazivost povrchu, tzv. albedo parametr, případně další vlastnosti).

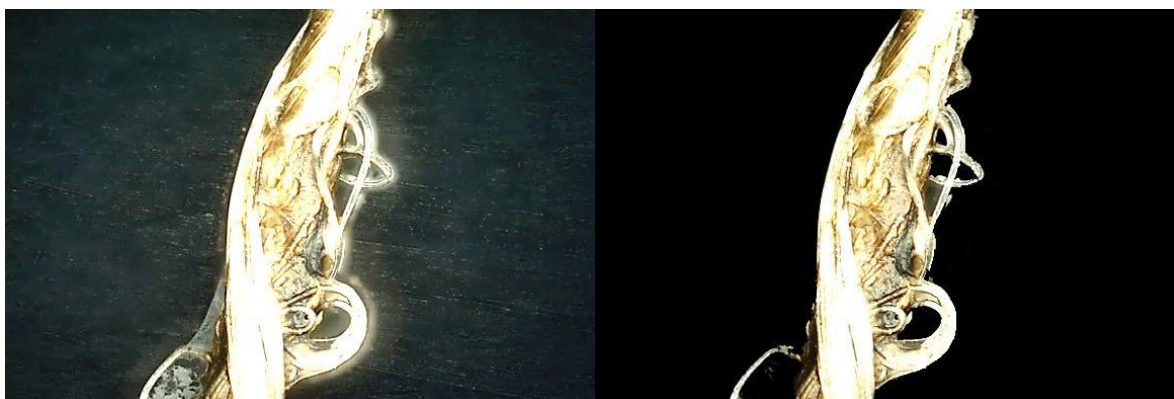
Výsledkem tohoto přístupu byl návrh nanovláknenného nosiče, který byl vyroben dle kapitoly 2.2.1 a, obrázek 39 vzorek C, ovšem nosná nit a nanovláknenný povrch byl vyroben v barvě bílé. Tzv. „ideální“ nastavení systému bylo z množiny možných zvoleno následovně. Černé zbarvení v obraze odpovídá pozadí, což bylo zajištěno snímáním objektu v temném poli. Světlé odstíny bílé až šedé odpovídají povrchu nosiče, což bylo zajištěno při výrobě nosiče (nosič byl produkován v bílé barvě, šedé odstíny mohou v obraze vznikat v důsledku stínění). Odstíny žluté až hnědé odpovídají mikrobiálnímu biofilmu, kde odstín je způsoben přirozeným zbarvením biofilmu (závislé na použité mikrobiální kultuře). Principem analýzy je rozpoznat pro člověka zřejmé vizuální rozdíly barevného zastoupení (při zanedbání jasu) a detekovat biofilm. V detekovaném biofilmu je dále cílem charakterizovat parametry struktury, kinetiku růstu a další.

4.2. Před-zpracování a vylepšení obrazu

Metody pre-processingu slouží k nápravě poškozeného obrazu, například korekce světelné nehomogenity nebo vinětace v důsledku nedostatečného nebo nekvalitního osvětlení. Tyto vady je možné korigovat správným seřízením snímací aparatury, správným nasvícením objektu a materiálovými charakteristikami snímaného objektu. Navzdory „ideálnímu“ nastavení může stále docházet k situacím, kdy se v obraze objeví artefakty, které by mohly při následovném hodnocení způsobovat problémy. Z toho důvodu byl zvolen přístup za využití komerčního softwaru, který vcelku jednoduše umožňuje globální korekce zpracovávaného obrazu pro vylepšení následné detekce a analýzy obrazu. Zvolen byl volně dostupný software pro úpravu obrazu Paint.NET (dostupný na <http://www.getpaint.net>). V rámci tohoto softwaru byly snímány obrazy upravovány, resp. probíhalo zostření obrazu, úprava jasu a kontrastu. Tyto operace byly aplikovány na celý obraz (včetně oblastí obsahující biofilm a oblastí s nanovlákný).

4.2.1. Korekce pozadí

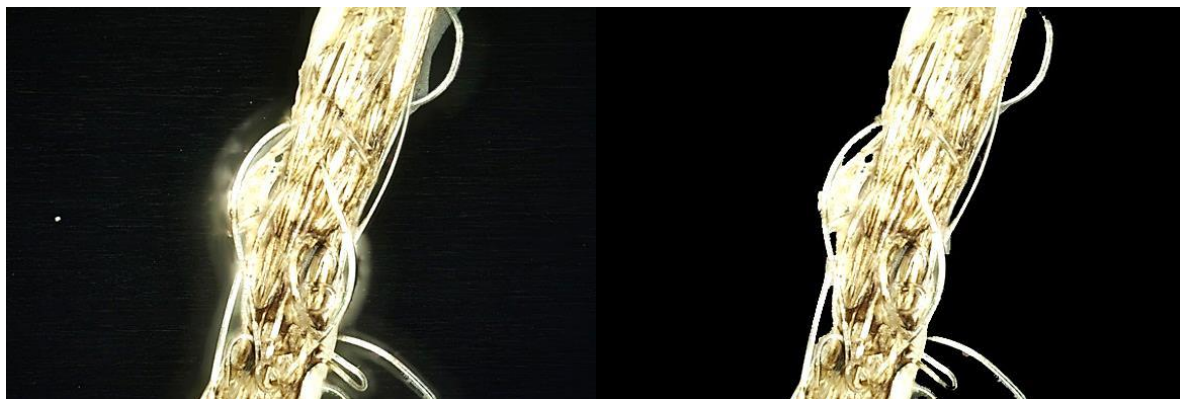
Původní myšlenka úpravy pozadí, v důsledku jeho nehomogenit, bylo využití maskovacího obrazu (snímek podložního sklíčka, bez vzorku). Tato maska by dále byla v průběhu úpravy obrazu odečítána od originálního obrazu. Bohužel v průběhu hodnocení nebyl přístup shledán vhodným, jelikož docházelo i k odstraňování částí nosiče a biofilmu (v místech, kde byl biofilm více mohutný). Přešlo se k jinému řešení, které bylo ale časově náročnější. Selektivně byl upravován jas pozadí v obraze, který místně vykazoval světlejší části (přesvícení díky přídavné lampě). Pozadí bylo korigováno (ztmavováno) ve výše uvedeném freeware programu, během této lokální operace nedošlo k poškození nebo jakýmkoliv úpravám zbytku obrazu (nosiče ani biofilmu). Tyto operace byly aplikovány shodným postupem a ve shodné míře na všechny obrazy experimentu (chyba globální úpravy obrazu je tím minimalizována).



Obrázek 121 – Příklad korekce pozadí v obraze, obraz před a po zpracování v externím programu

4.2.2. Korekce objektů v obraze

Pokud obraz vyžadoval odstranění nežádoucích objektů, byly korigovány i tyto; jednalo se však jen o odstranění škrábanců, prachu z pozadí nebo tzv. halo-efektu (při přeastření obrazu dojde k vytvoření halo-efektu kolem hran objektu). V rámci lokálních korektur nikdy nebyly jakýmkoli způsobem korigovány žádné oblasti obsahující biofilm nebo nanovláknna.



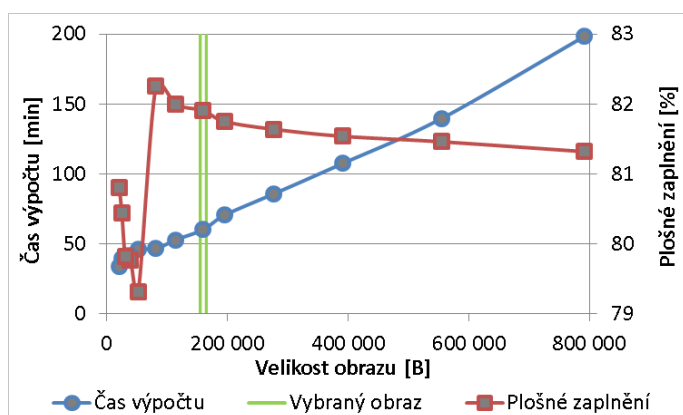
Obrázek 122 – Příklad korekce halo-efektu v obraze, obraz před a po zpracování v externím programu

Po před-úpravě obrazu se obraz následně převede do příslušného barevného modelu podle toho, jaký parametr se bude určovat (LAB, HSV, šedotónový či binární barevný prostor).

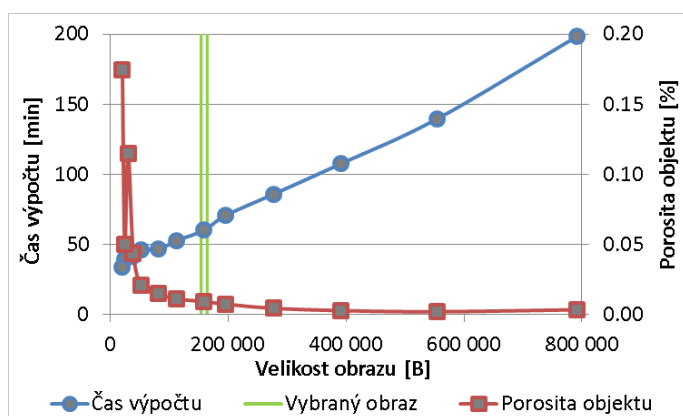
4.2.3. Komprese obrazu

V rámci předzpracování obrazu dochází mimo jiné i k další úpravě obrazu, a tou je komprese. Kompresi dat je zpracování počítačových dat s cílem zmenšení jejich objemu při současném zachování informací v datech obsažených. Úkolem komprese dat je zmenšit potřebné množství dat před jejich vyhodnocením. Při zde navrhované kompresi je používána ztrátová komprese, při které jsou některé informace nenávratně ztraceny a nelze je zpět rekonstruovat. Pro úpravu velikosti obrazu byla v programovém prostředí Matlab použita funkce „*imresize*“ (funkce změny velikosti obrázku). Určující interpolací byla zvolena metoda „*nearest neighbor*“, interpolace nejbližšího souseda, kde algoritmus vybere hodnotu nejbližšího bodu a vůbec nebere v úvahu hodnoty v sousedních bodech. Metoda dává po částech konstantní interpolaci.

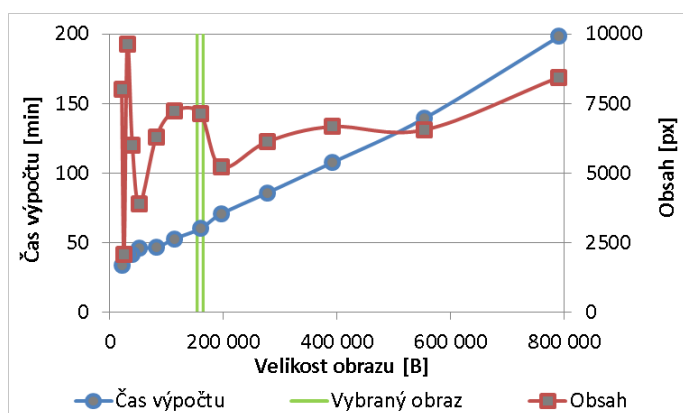
Ačkoli při tomto procesu dochází k určitému zkreslení dat (zkreslení obrazu), je možné ztrátu těchto dat tolerovat. Kompresí se především sníží nároky na potřebné výpočetní zdroje (výkonnost procesoru, paměti aj.) a dojde k výraznému urychlení výpočetního času při zpracování komprimovaných obrazů. Jaký vliv může mít komprese obrazu na jednotlivé parametry je ukázáno na vybraných grafech níže. Komprese vyšší než 80 % výrazně ovlivňuje výpočet parametrů. 80% komprese je v grafu označena svislou dvojitou zelenou čarou. Ve všech grafech dochází pro více než 80% kompresi (tj. v grafu vlevo od zelené linky) k velkému zkreslení dat nebo k jejich oscilaci.



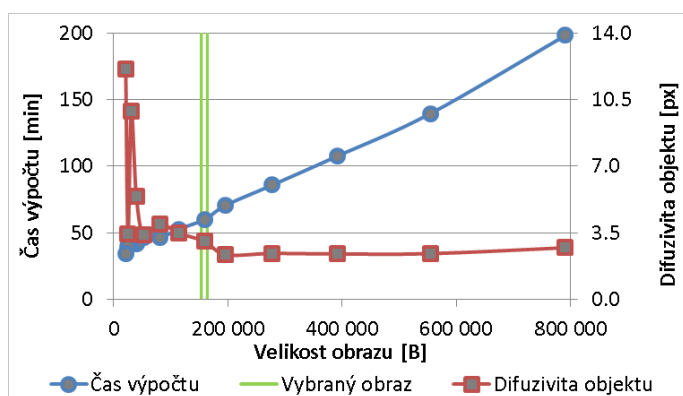
Obrázek 123 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – plošné zaplnění



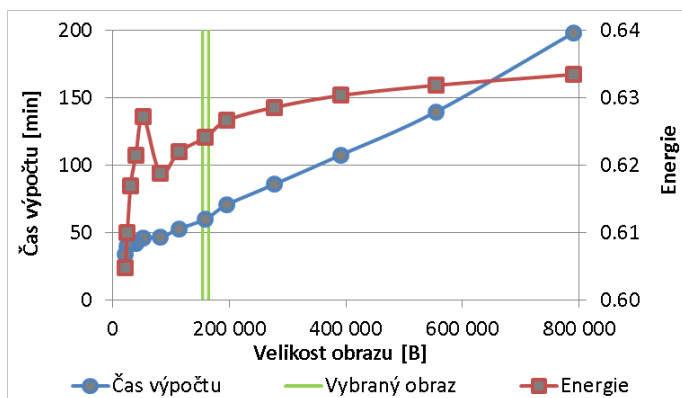
Obrázek 124 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – porosita objektu



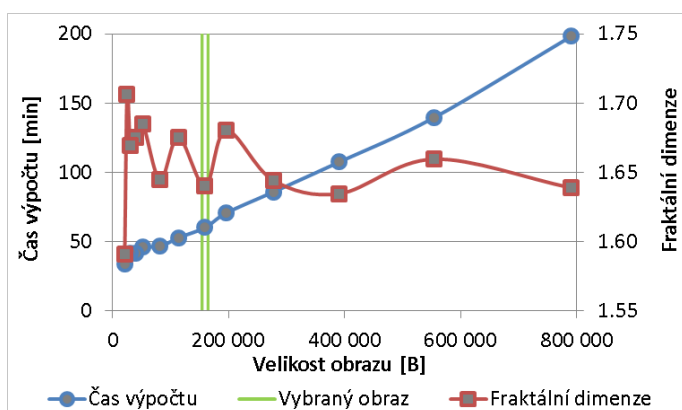
Obrázek 125 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – obsah objektu



Obrázek 126 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – difuzivita objektu



Obrázek 127 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – energie



Obrázek 128 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – fraktální dimenze

Kompresní poměr (podíl velikosti původních dat k velikosti komprimovaných dat) byl zvolen tak, aby byl roven $790\,875 / 159\,244 (B) = 5 : 1$. Obraz je 5x zmenšen. Úspora datového místa je rovna 80 %. Výpočet parametrů v obraze se urychlí z 198.148 minut na 60 minut (výpočet pro 100 obrazů), výpočet je 3.3x rychlejší.

Tabulka 10 – Přehled charakteristik vstupního a výstupních komprimovaných obrazů

Pořadí	Velikost [B]	Rozlišení [px]				Kompresa [%]	Čas pro 100 obrazů [min]
1	790 875	3635	x	2723	= 9 898 105	0.0	198.148
2	554 326	2908	x	2178	= 6 333 624	29.9	139.503
3	391 066	2326	x	1742	= 4 051 892	50.6	107.532
4	277 171	1861	x	1394	= 2 594 234	65.0	85.860
5	195 922	1489	x	1115	= 1 660 235	75.2	70.680
6	159 244	1191	x	892	= 1 062 372	79.9	60.093
7	113 432	953	x	714	= 680 442	85.7	52.832
8	81 462	762	x	571	= 435 102	89.7	46.510
9	52 095	600	x	400	= 240 000	93.4	46.183
10	39 373	480	x	320	= 153 600	95.0	41.842
11	30 536	384	x	256	= 98 304	96.1	41.925
12	24 830	307	x	205	= 62 935	96.9	39.970
13	20 835	246	x	164	= 40 344	97.4	34.143

* (originální obraz = Nano2_long_078dni = pořadí (1))

Kapitola „*Obrazového hodnocení biofilmových struktur – snímání a předzpracování obrazu*“ shrnuje základní poznatky ohledně možností korekce snímané scény a ohledně následné úpravy obrazu (korekce pozadí, objektů v obraze a komprese obrazu). Všechny výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.

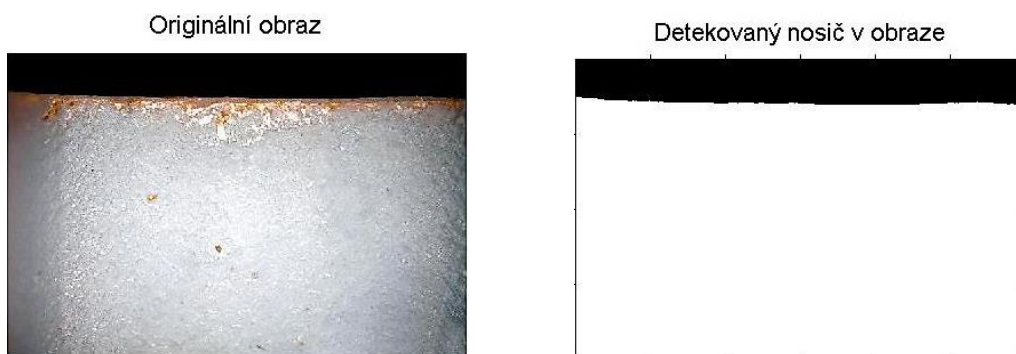
Hlavním výsledkem při zpracování obrazu je potvrzení nutnosti úpravy pozadí a jistých objektů v obraze, jelikož snímací aparatura nebude nikdy natolik „dokonalá“ aby zabránila vzniku těchto artefaktů. Kapitola komprese obrazu měla za cíl stanovit jaký vliv má rozlišení obrazu (resp. komprese obrazu) na vliv vyhodnocovaných parametrů. Výsledkem práce byla volba daného rozlišení obrazu (resp. dané komprese obrazu), které umožní urychlení výpočetního času, ale zároveň stále nedojde k narušení či změně měřených charakteristik.

4.3. Segmentace obrazu

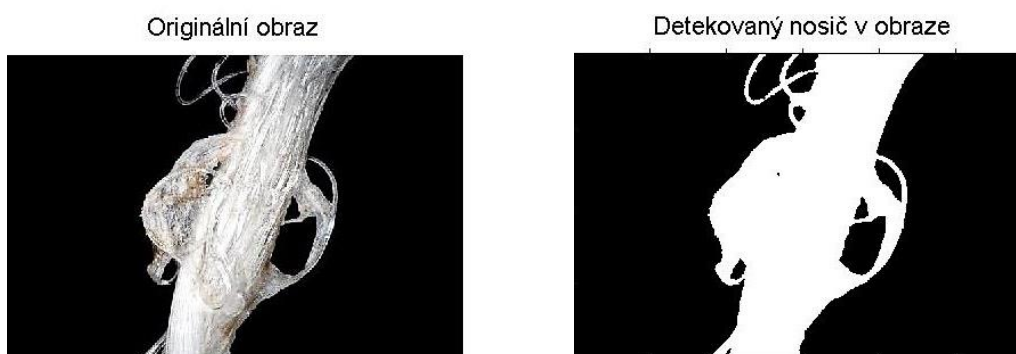
Segmentace obrazu je základním úkonem při zpracování, je velmi důležitá pro následnou analýzu obrazu. Jedná se o proces, který rozděluje obraz do disjunktních oblastí, obvykle odpovídají určitým objektům (například na pozadí zkoumané oblasti a hledané objekty). Jakmile jsou určité objekty izolovány, mohou být měřeny, klasifikovány a analyzovány. (Wu et al. 2008) Prahování je základní technikou identifikace oblastí, která je užitečná zejména pro stabilní objekty umístěné na jednotném kontrastním pozadí. Pro zde vyhodnocované obrazy po fázi předzpracování obrazu je pozadí jednotně černé, a tedy použití prahování k získání určitých dat je příhodné. K získání specifických dat v podobě separovaného biofilmu byl přístup mnohem komplikovanější.

4.3.1. Segmentace podkladového materiálu (nosiče) v obraze

Aby bylo možné vypočítat obsazenost povrchu nosiče bakteriálním biofilmem, je nutné v obraze určit samotnou plochu nosiče. Plocha nosiče se určuje ze součtu plochy, kterou na snímku zabírá nosič (nosič neobsazený) plus plocha biofilmu (jelikož předpokládáme, že biofilm roste na nosiči). Pro detekci nosiče v obraze byla použita metoda prahování, metoda Otsu. (Wu et al. 2008; Otsu, 1979; Matlab 2013). Otsu metoda určuje práh dle minimalizace rozptylu mezi oběma výslednými segmenty. Hodnoty jsou, které jsou nižší, než práh odpovídají pozadí, hodnoty vyšší než práh odpovídají detekovaným objektům (zde detekovanému nosiči), (Wu et al. 2008; Otsu, 1979; Matlab 2013). Na *obrázcích 129 a 130* je uveden příklad detekce nosičů v obraze.



Obrázek 129 – Příklad detekce nosiče v obraze pro plastový komerční nosič AnoxKaldnes (vpravo bílá oblast odpovídá detekovanému nosiči)



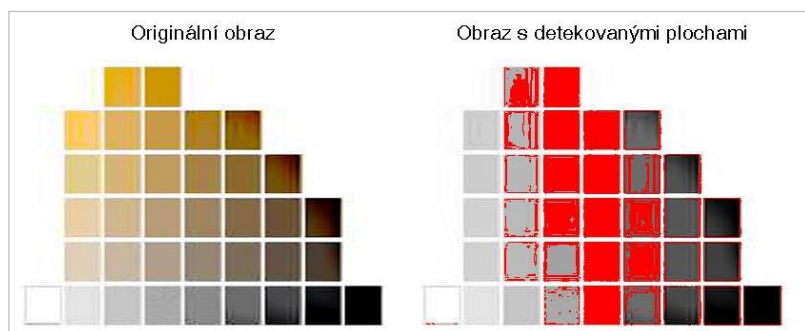
Obrázek 130 – Příklad detekce nanovláknenného nosiče v obraze (vpravo bílá oblast odpovídá detekovanému nosiči)

4.3.2. Segmentace biofilmu v obraze

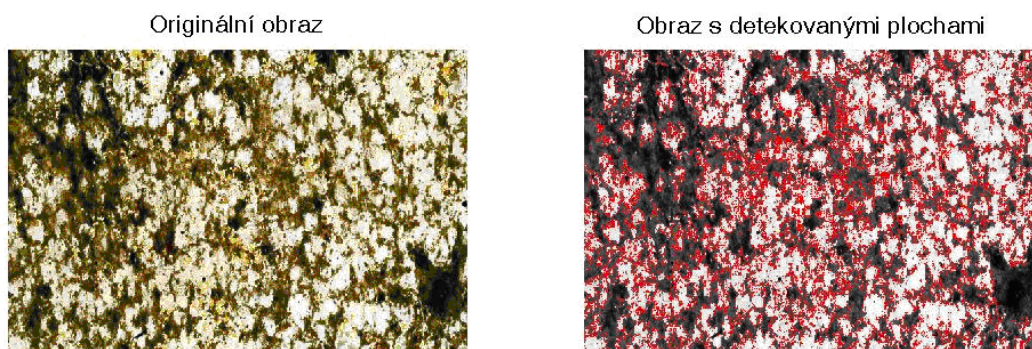
Návrh segmentace biofilmu v obraze, aneb vývoj metody jak separovat biofilm od zbytku obrazu, probíhal celé období řešení disertační práce. Prvopočáteční řešení bylo založeno na využití šedotónového obrazu a určení barevného rozsahu. Dále bylo využito algoritmu K-Means a převodu do barevného prostoru LAB; nakonec byla nejvhodnějším postupem shledána separace složky saturace z barevného prostoru HSV.

1. Segmentace přímým prahováním, metodou Otsu

Snímek byl transformován z barevného prostoru (RGB) přímo do šedotónového prostoru. Na základě předem vytvořené kalibrace (dle *obrázku 131*) byl určen rozsah, v němž můžeme detekované objekty s jistou pravděpodobností prohlásit za hledané oblasti (biofilm). Výhodou tohoto přístupu je značná jednoduchost, nevýhodou pak nepřesnost hodnocení (existují přechodové oblasti, které způsobují velkou chybu hodnocení). Další nevýhodou je nezpůsobitelnost a nevhodnost postupu, pokud se v obraze nacházejí další podobné oblasti, jako oblasti hledané (například přítomnost, resp. viditelnost nosiče v obraze, stíny vržené mohutnějším biofilmem apod.).



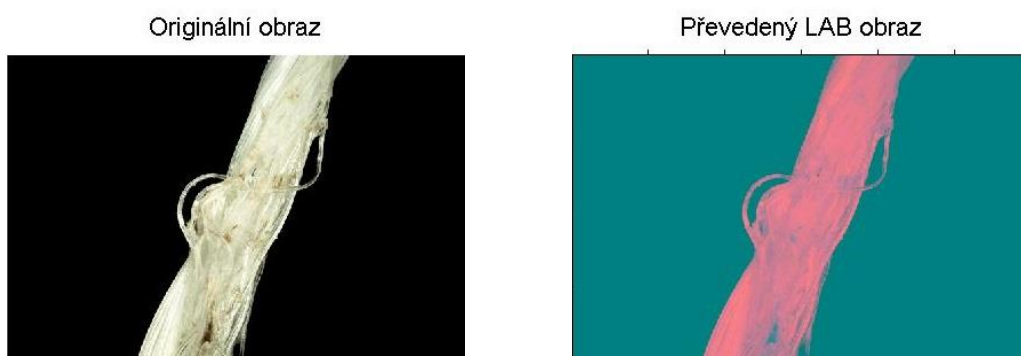
Obrázek 131 – Kalibrace snímků škály barev (červená označuje oblasti, které budou hodnoceny)



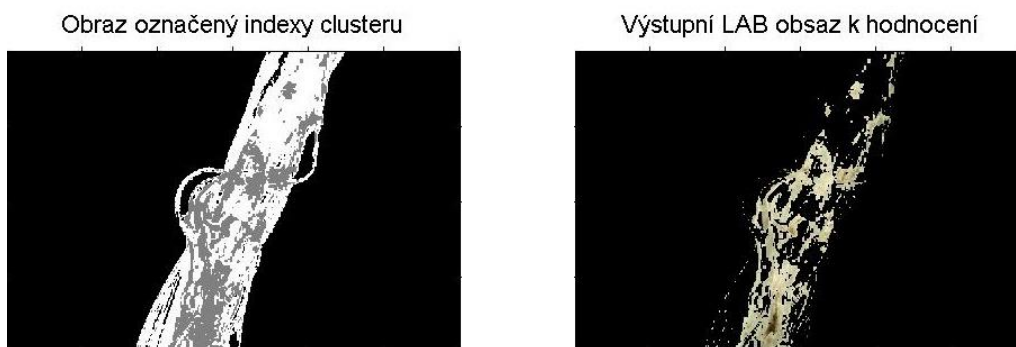
Obrázek 132 – Příklad detekce biofilmu daným algoritmem (červená značí detekované oblasti biofilmu)

2. Segmentace převedením do CIELAB barevného prostoru

Druhá metoda selekce biofilmu v obraze byla založena na převodu originálního obrazu do barevného prostoru CIE $L^*a^*b^*$, kde se provádí segmentace do jednotlivých shluků (barevných ploch) shlukovacím (clustering) algoritmem K-Means (dle kapitoly 2.5.2 v teoretické části práce). Tímto způsobem lze vytvořit jednotlivé snímky, které rozdělují vstupní obraz dle barev (tj. ze vstupního obrazu se selektuje „ k “ výstupních obrazů, jak dokumentuje příklad uvedený níže). V případě předkládané disertační práce je zvolena segmentace do tří shluků. První shluk reprezentuje povrch nosiče, který není obsazen biofilmem (barva bílá až šedá), druhá segmentace odpovídá biofilmu na nosiči (barva žlutá až tmavě hnědá) a třetí segmentace odpovídá pozadí (barva černá, data v principu nepřinášejí žádné informace vhodné pro další zpracování).

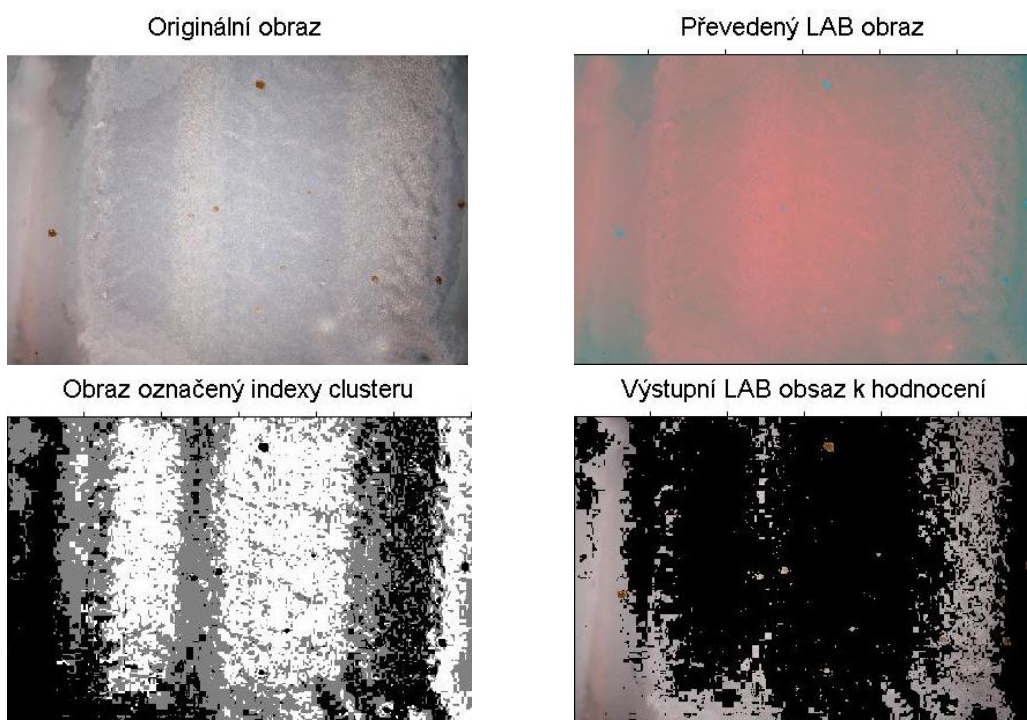


Obrázek 133 – a) Vstupní, původní obraz určený k detekci; b) Původní obraz transformovaný do barevného prostoru CIELAB;



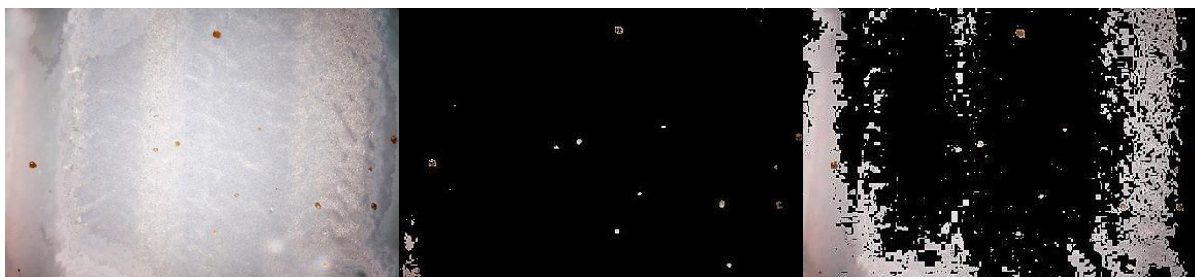
Obrázek 133 – a) Příklad shlukovacího algoritmu K-Means v CIELAB barevném prostoru, ukázka K-Means algoritmu (černá = pozadí, bílá = nosič, šedá = biofilm); b) Shluk reprezentující biofilm na nosiči v separovaném obraze.

Nevýhodou tohoto přístupu je velká časová náročnost převodu původního obrazu do CIELAB barevného prostoru, časová náročnost metody K-Means. Navíc ne vždy je proces iterace hledání minima Euklidovské vzdálenosti, v rámci metody K-Means, úspěšný. Pro tuto metodu občas dochází k chybnému zařazení dané oblasti do shluku a nakonec dojde k chybnému vyhodnocení nebo až k přerušení procesu chybovým hlášením. Chybné začlenění oblastí do daného shluku je znázorněno na následujícím obraze.



Obrázek 134 – a) Vstupní, původní obraz určený k detekci; b) Původní obraz transformovaný do barevného prostoru CIELAB; c) Příklad shlukovacího algoritmu K-Means v CIELAB barevném prostoru, ukázka chybného začlenění oblastí do daných shluků; d) Chybně detekovaný biofilm v obraze, detekován je i podložní nosič.

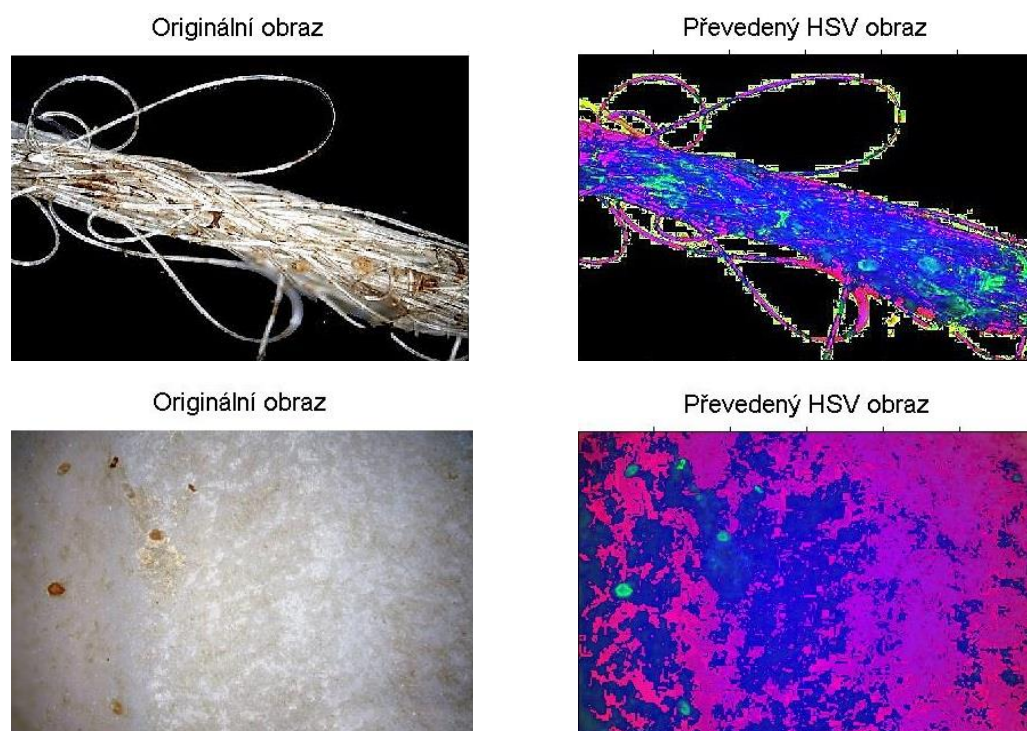
Chybný proces přiřazování byl zjištěn především u obrazů, které snímali komerční nosič, u nanovláknenného nosiče se tyto chyby neprojevovali, pravděpodobně díky velice dobrému kontrastu nosiče a biofilmu (nanovláknenné nosiče jsou čistě bílé barvy, nosiče komerční jsou barvy šedé).



Obrázek 135 – Segmentace převedením do CIELAB; a) Původní obraz, b) Ideální detekce biofilmu, c) Detekovaný biofilm v CIELAB barevném prostoru (příklad chybné detekce)

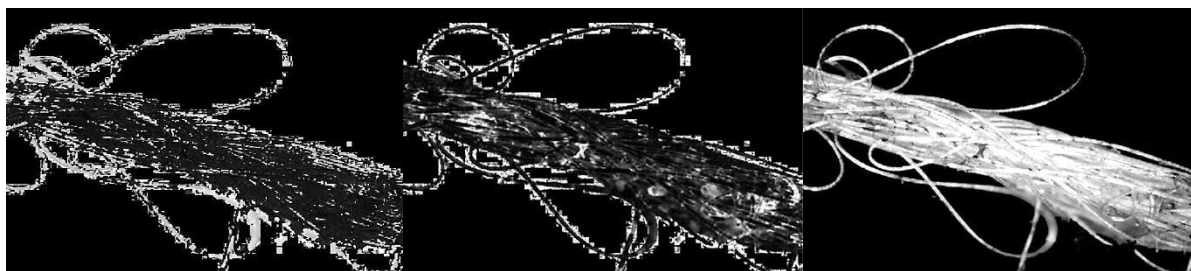
3. Segmentace převedením do HSV barevného prostoru

Zvolenou metodou úpravy obrazu pro lepší charakterizaci bakteriálního biofilmu je převod originálního obrazu do barevného prostoru HSV, kde je využito jednotlivých vrstev HSV obrazu (Hue = odstín, barva; Saturation = saturace, nasycení; Value = hodnota).



Obrázek 136 – Vstupní, původní RGB obraz a obraz převedený do HSV barevného prostoru pro nanovláknenný a komerční nosič biomasy

Pro selekci biofilmu v obraze je využito složky S (Saturation). Saturace představuje množství šedi v poměru k odstínu, měří se v procentech od 0 % (šedá) do 100 % (plně sytá barva). V obrazech se hodnoty pozadí ve vrstvě (S) pohybují v rozmezí 3 % až 39 %. Z této myšlenky lze vyvodit, že hodnoty větší než 40 % sytosti lze označit za oblasti odpovídající bakteriálnímu biofilmu. Separované vrstvy HSV obrazu na obrázku níže tuto domněnku potvrzují.

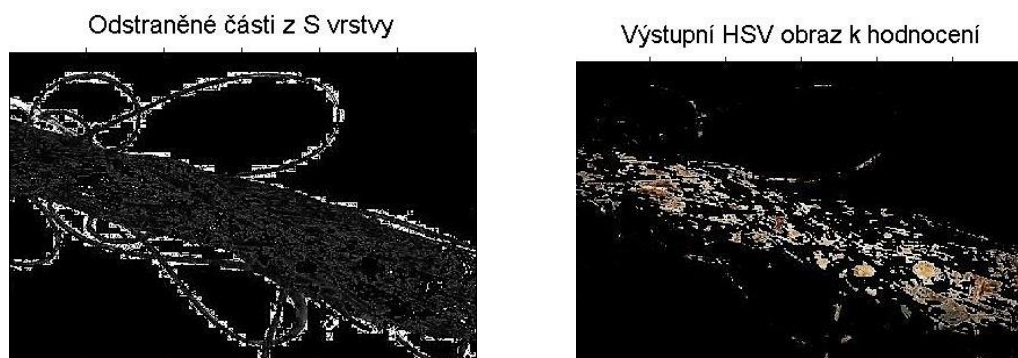


Obrázek 137 – Separované vrstvy obrazu v HSV prostoru (zleva postupně vrstvy H, S, V)

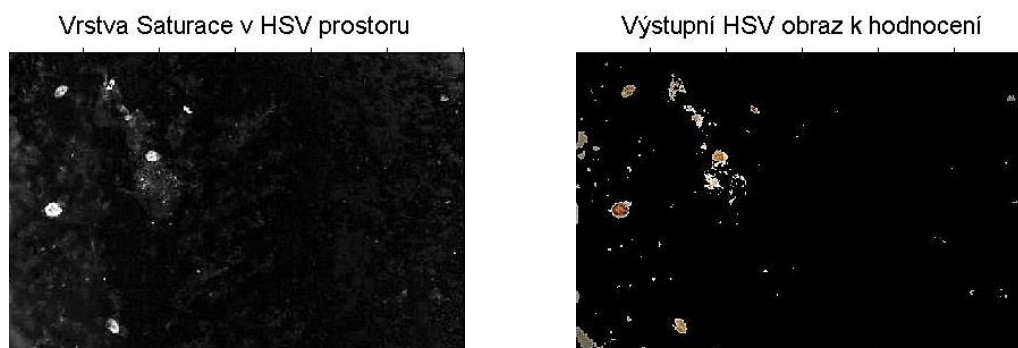
V separované vrstvě obrazu (vrstva S, viz *obraz 137* výše) lze vidět, že ve vrstvě jsou vybrány také části obrazu označující jednotlivá vlákna (většinou jen ta, která jsou odtržena od hlavní nitě). Jelikož pro přesnou detekci biofilmu je nutné tyto vlákna odstranit, bylo k tomuto účelu využito vrstvy H (Hue = barva). Ve vrstvě H jsou hodnoty pozadí v rozsahu hodnot 0 až 0.2, hodnoty oblasti nanovláken (nepokrytých biofilmem) jsou v rozsahu 0.2 až 0.7 (kde maximální rozsah vrstvy H je 0.0 až 1.0). Hodnoty označující oblasti separovaných nanovláken (hodnoty 0.2 až 0.7) byly určeny empiricky autorem disertační práce.

Navrhovaným postupem, jak docílit vrstvy, která bude obsahovat jen biofilm je operace odečtení vrstev $\{ \text{Saturation} - \text{Hue}^* \}$, kde vrstva H je prahována tak, že jsou v obraze odstraněny ty pixely, které mají hodnotu menší než 0.2 nebo naopak větší než 0.7.

$$\{S - H^*\} = \{S \text{ vrstva} - \text{prahovaná vrstva } H \text{ taková že } (0.2 \leq f_{(H)} \leq 0.7)\} \quad (21)$$



Obrázek 138 – Separované vrstvy obrazu v HSV prostoru pro nanovláknenný nosič a) Znárodný prahovaný rozdíl $\{S \text{ vrstva} - \text{prahovaná vrstva } H \text{ taková že } (0.2 \leq f_{(H)} \leq 0.7)\}$; b) Výsledný detekovaný biofilm



Obrázek 139 – Separované vrstvy obrazu v HSV prostoru pro komerční nosič a) Znárodný prahovaný rozdíl $\{S \text{ vrstva} - \text{prahovaná vrstva } H \text{ taková že } (0.2 \leq f_{(H)} \leq 0.7)\}$; b) Výsledný detekovaný biofilm

Vyhodnocený rozdíl je dále pomocí prahování převeden na binární obraz, který je dále odečten od původní vrstvy S. Konečný rozdíl dále aplikujeme na původní obraz, resp. z původního obrazu jsou

vybrány jen oblasti, které odpovídají danému rozdílu $\{S-H^*\}$ (dle rovnice 21). Výsledný obraz obsahující jen separovaný biofilm (zobrazen na obrázku 138 a 139), je vstupním obrazem pro následné výpočty plošných a texturních parametrů obrazu.

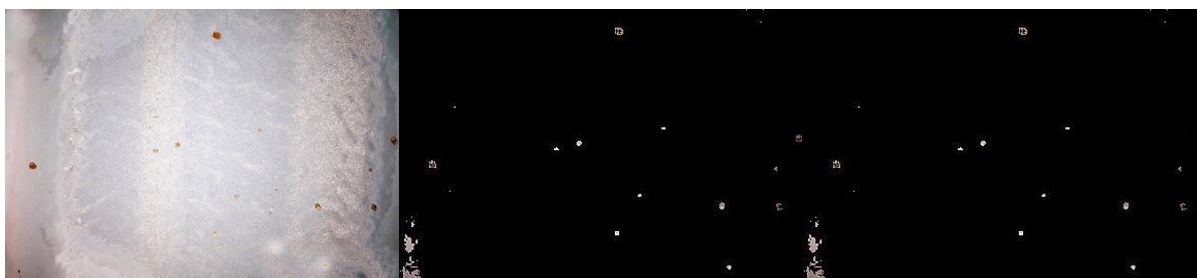


Obrázek 140 – a) Vrstva S bez úpravy, b) Vrstva $\{S-H^*\}$, po úpravě odstranění nežádoucích vláken

Přístup selekce biofilmu z HSV vrstvy je velice rychlý, časově nenáročný a výpočetně velice snadný. Zde je uveden krátký přehled převodu vstupního, původního RGB obrazu do daného barevného prostoru:

Převod a úprava obrazu v šedotónovém barevném prostoru –	čas 5.322 sekund
Převod a úprava obrazu v CIELAB barevném prostoru –	čas 3.022 sekund
Převod a úprava obrazu v HSV barevném prostoru –	čas 0.842 sekund

Z tohoto přehledu je zřejmé, že selekce biofilmu v HSV prostoru je až 3.5x rychlejší než výpočet v CIELAB prostoru, který s sebou přináší navíc i nesprávnosti výpočtu nebo dokonce přerušení algoritmu (z důvodu využití nestabilního K-Means algoritmu). Přístup výpočtu v HSV prostoru nepřináší žádné chyby výpočtu ani nedochází k chybným zařazením dané oblasti do příslušného shluku.

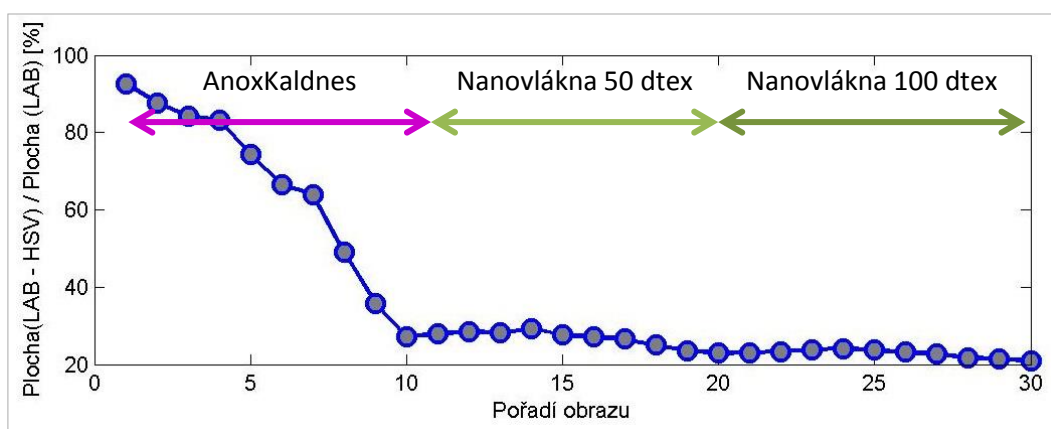


Obrázek 141 – a) Původní obraz; b) Ideální detekce biofilmu; c) Detekovaný biofilm v HSV barevném prostoru

Výše byla vyjádřena myšlenka, že chybný proces metody K-Means v CIELAB barevném prostoru byl zjištěn především u obrazů, které zachycovali komerční nosič, u nanovláknenného nosiče se tyto chyby neprojevovali, nebo jen velmi málo. Níže je uveden graf, který tuto domněnku potvrzuje. Na ose-x jsou v abecedním pořadí uvedeny dané obrazy. Prvních 10 obrazů odpovídá komerčnímu nosiči AnoxKaldnes, a to v pořadí ve kterém byly v čase snímány (tj. první obraz odpovídá 1 dni, dále následuje 3, 8, 14, 28, 44, 56, 78, 100 a 119 dní). Osa-x v oblasti 11 až 20 pořadí obrazu jsou obrazy nanovláknenných nosičů s nánosem 50 dtex (dny odpovídají dnům stejně jako na nosiči AnoxKaldnes). Osa-x v oblasti 21 až 30 pořadí obrazu jsou obrazy nanovláknenných nosičů s nánosem 100 dtex (dny

odpovídají dnům stejně jako na nosiči AnoxKaldnes). Osa-y vyjadřuje absolutní rozdíl mezi prostory CIELAB a HSV (vztaženo k CIELAB obrazu, $\{LAB-HSV\} / LAB$, jednotkami na ose-y jsou procenta).

Z grafu na *obrázku 142* je zřetelně vidět, že pokud jde o nanovláknenný nosič, pak je rozdíl mezi oba přístupy (hodnocení v CIELAB či HSV prostoru) „nevelký“ (rozdíl je maximálně do 20 %, tato hodnota je neměnná). Výrazný rozdíl je zřetelný v první části grafu (který odpovídá komerčnímu nosiči). Klesavá tendence této křivky v daném úseku ukazuje, že s rostoucím zaplněním nosiče biofilmem klesá rozdíl mezi oba přístupy (hodnocení v CIELAB a HSV barevném prostoru). Nejvyššího rozdílu (téměř 100 %) je docíleno pro komerční nosič na počátku jeho kolonizace (3 den). Jinak řečeno čím méně je vidět podkladového nosiče (resp. čím více je nosič osídlen biofilmem), tím je metoda přesnější a získáváme relevantnější výsledky v CIELAB prostoru. Důvodem špatného hodnocení v CIELAB prostoru komerčního nosiče je především materiálová struktura AnoxKaldnes nosiče (vysoká odrazivost povrchu, dochází k lokálnímu přesvícení, díky morfologii nosiče dochází k zastínění určitých částí nosiče). Navržená metoda detekce biofilmu v HSV prostoru uvedené nevýhody nemá.



Obrázek 142 – Rozdíl v přístupu hodnocení v CIELAB a HSV barevném prostoru

Kapitola „*Obrazového hodnocení biofilmových struktur – segmentace obrazu*“ shrnuje základní poznatky ohledně možností segmentace pořízeného obrazu (scény), a to jak segmentace nosiče v obraze, tak segmentace objektů na nosiči. Všechny výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.

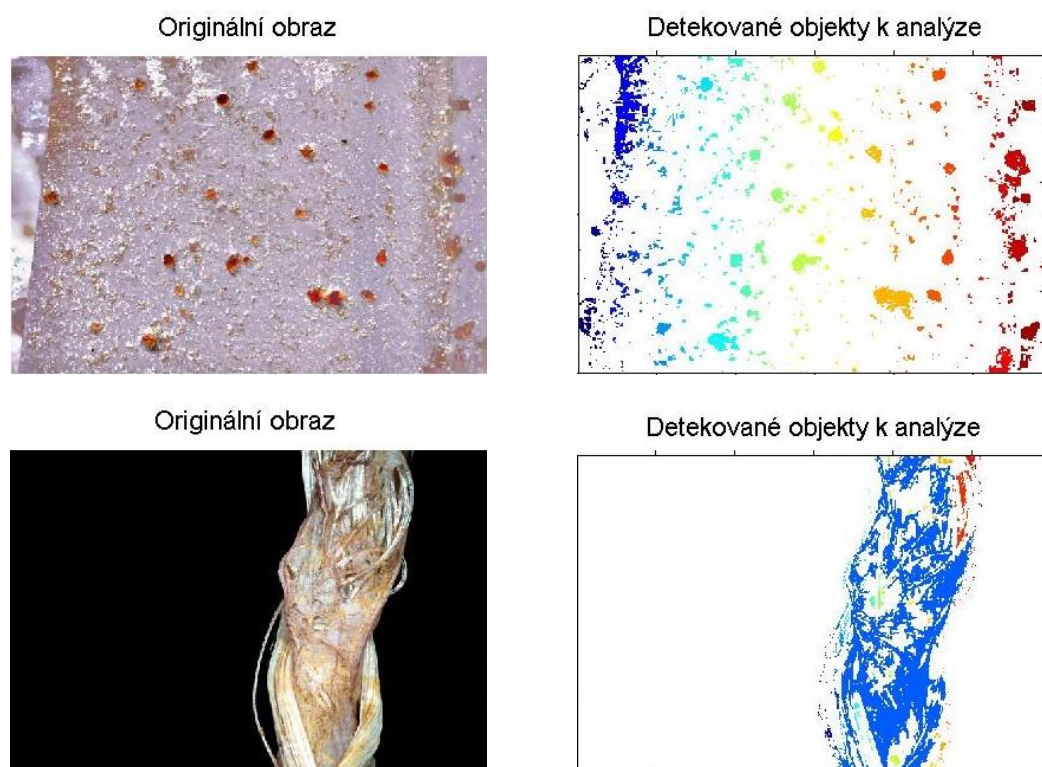
Hlavním výsledkem při segmentaci obrazu je potvrzení nutnosti využití HSV barevného prostoru, jako jediného, u kterého nedochází k vyhodnocování nežádoucích složek obrazu (nežádoucích objektů). Finální rozpoznání biofilmu v obraze je založeno na rozdílu složek $\{S \text{ vrstva} - \text{prahovaná vrstva } H \text{ taková že } (0.2 \leq f_{(H)} \leq 0.7)\}$, kde vrstva S obsahuje jak biofilm, tak také detekovaná vlákna (v případě nanovláknenných nosičů). Vhodnou segmentací vrstvy H docílíme separace vláken z obrazu. Rozdílem obou těchto vrstev $\{S - H^*\}$ získáme metodu vhodnou k separaci biofilmu z obrazu.

4.4. Morfologické zpracování obrazu

Morfologické zpracování (jehož teorie je popsána v kapitole 2.4 v teoretické části práce) je prakticky používáno v celém zde navrhovaném algoritmu. Jedná se především o použití operací morfologického uzavření pro operace výpočtu pozadí, dále pak pro výpočet regionálních parametrů excentricity, ekvivalentního průměru, Eulerova čísla, orientace, solidity a při hodnocení difuzivity objektů. Dále se morfologického zpracování využívá při identifikaci velikostní distribuce (tzv. granulometrie), kde je využito strukturního prvku, jehož velikost se mění s každým průchodem skrze smyčku morfologického otevření.

4.5. Charakterizace a identifikace oblastí

Identifikace oblastí je proces, který umožňuje identifikaci jednotlivých regionů (objektů či oblastí) v obraze. V předkládané disertační práci je identifikace oblastí provedena dvěma po sobě následujícími kroky, a to pomocí metody „*bwboundaries*“ následované metodou „*regionprops*“. Obě metody jsou součástí programového prostředí Matlab, Image Processing toolboxu (Matlab 2013).



Obrázek 143 – Příklad identifikace oblastí pomocí navrženého algoritmu v Matlabu pro komerční nosič AnoxKaldnes a pro nanovláknenný nosič

Metodu „*bwboundaries*“ lze aplikovat pouze na binární obraz. Metoda detekuje vnější a vnitřní hranice objektu. Výstupem metody jsou tři parametry: celkový počet detekovaných objektů (N); dvourozměrné pole nezáporných celých čísel představující matici sousednosti objektů (L); dvourozměrné pole, jehož délka odpovídá počtu objektů, kde v rámci každého prvku pole existuje matice, která určuje hranice daného objektu (B). (Matlab 2013)

Pro všechny detekované objekty v obraze (N) lze v rámci matice sousednosti (L) označit jednotlivé objekty pomocí pole obsahující hranice (B). Každý separovaný objekt je uložen v samostatné matici (X), kde pro každý detekovaný objekt je volána metoda „*regionprops*“. (Matlab 2013).

Metoda „*regionprops*“ determinuje určité vlastnosti jednotlivých regionů (oblastí) v binárním obraze (resp. v separovaných maticích X). V rámci metody „*regionprops*“ (Matlab 2013) byly determinovány parametry „*Obvod, Obsah, Kulatost objektu, Excentricita, Ekvivalentní průměr, Eulerovo číslo, Orientace, Solidita objektu a Granulometrie*“. Parametry „*Porosita, Difuzivita, Texturní entropie, Energie, Homogenita, Fraktální dimenze, Horizontální a vertikální běhová délka*“ byly vytvořeny na základě odborné literatury, informace byly čerpány především z (Lewandowski and Beyenal, 2007).

Ze všech těchto parametrů je vytvořena finální matice výsledků, která je dále korigována. Korekce matice spočívají především ve vynechání objektů, které mají určité vlastnosti. V obrazové analýze obecně platí, že menší objekty produkují větší chyby měření (Grijnspeerdt, 1997). Tato myšlenka je logická, neboť v obraze se nachází mnoho „malých“ objektů, díky čemuž dochází ke zkreslení výsledků „velkých“ objektů. Objekty s půdorysnou plochou menší než například 0.1 % z celkové plochy obrazu (celkového počtu pixelů v obraze; přesná hranice velice záleží na měřítku či rozlišení snímku) by neměly být brány v úvahu (Grijnspeerdt, 1997). V souladu s touto skutečností bylo na základě empirického stanovení autorem disertační práce stanoveno, že objekty plochou menší než 6 pixelů² nebo průměrem menší než 1.5 pixelu budou z výpočetní matice odstraněny (tj. plochou menší než 51.6 μm^2 nebo průměrem menší než 4.4 μm). Ovšem například parametry plošné zaplnění povrchu nosiče biofilmem, parametr počet objektů a parametr difuzivita je nutné počítat pro všechny objekty v obraze (bez redukce), jelikož jinak by došlo k velkému zkreslení (podcenění obsazené plochy) v důsledku zanedbání malých objektů, kterých je největší množství.

4.5.1. Plošné parametry

Vlivy podmínek v biologickém reaktoru (zatížení substrátem, doba zdržení, střížné síly aj.) a vliv mikrobiálních charakteristik (typ populace, míra růstu biomasy aj.) na výslednou strukturu bakteriálního biofilmu je diskutován stále ve velké míře, proto byl v předkládané disertační práci zvolen přístup využití analýzy obrazu. Obrazová analýza mikroskopických snímků s sebou přináší možnost získat nové informace, která standardními metodami odhalit nelze.

V rámci testování kolonizace nosičů, které probíhalo cca půl roku, byla získána data dlouhodobé kolonizace komerčních a nanovláknenných nosičů biomasy. Výsledky k tomuto měření jsou sepsány v kapitole 3.3 (ověření nosičů na modelové vodě obsahující fenoly), kde lze najít všechny vstupní i výstupní charakteristiky reaktoru. V kapitole dlouhodobá kultivace nosiče (kapitola 2.2.7b) lze najít základní výsledky kolonizace společně s fotografickou dokumentací. V následujících kapitolách jsou diskutovány výsledky získané z obrazové analýzy tohoto experimentu pro oba typy nosičů. Obrazová analýza biofilmu usedlého na nanovláknenný nosič v žádné publikované práci doposud hodnocena nebyla, hodnoceny byly pouze „standardní“ polymerní nosiče (jako je uvedený komerční nosič AnoxKaldnes).

V rámci pokusu byly v daném čase z reaktoru odebrány vzorky nosičů (nanovláknenný a AnoxKaldnes). Povrch těchto nosičů byl nasnímán celkem na šesti různých místech, tyto hodnoty sloužily

k průměrování naměřených výsledků. V každém hodnoceném obraze byly výše uvedeným postupem nalezeny jednotlivé objekty, u nichž byly charakterizovány zmíněné parametry (obvod, obsah, kruhovitost...). Pro všechny nalezené objekty byla spočtena základní statistická analýza (minimum, maximum, průměr, standardní odchylka, medián), pro přehlednost jen hlavní výsledky jsou uvedeny v grafech.

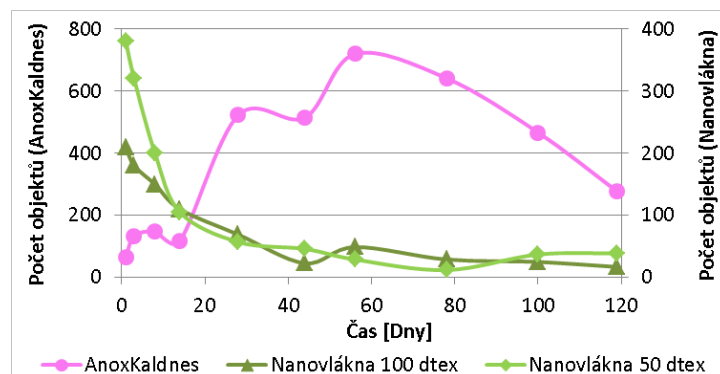
1) Počet objektů

Dle (La Motta 1980; Trulear 1982; Bryers 1982) plyne závěr, že počet objektů lokalizovaných na nosičích bude z počátku rychle růstu (dle dané adhesivity buněk v povrchu). Následně bude počet objektů lokalizovaných na nosiči v průběhu času klesat (dle kultivačních podmínek). Menší kolonie se spojují a vytváří větší celky, které v závěru kolonizace mohou pokrývat až celý povrch nosiče (tehdy bude počet objektů roven jedné). Naměřené výsledky v této práci se s domněnkou dle (La Motta 1980; Trulear 1982; Bryers 1982) vcelku shodují.

Na komerčním plastovém nosiči AnoxKaldnes je v začátku experimentu cca. 100 kolonií. V průběhu prvních dvou týdnů téměř nedochází ke změně počtu uchycených kolonií (rychlost růstu je cca. 5 kolonií/den), pravděpodobně proto, že biofilm se vytváří a ihned odpadá. Tento čas lze označit za dobu nutnou k transformaci (úpravě) povrchu nosiče. Bakterie v tomto čase vynakládají energii k narušení povrchu a teprve poté může dojít k masivnější kolonizaci. Navíc se mikroskopickým sledováním potvrdilo, že v této době mají mikroorganismy větší adhezi k solným krystalům (vytvářející se hned na počátku experimentu) než k povrchu nosiče. Při odsolování reaktoru tak může docházet k redukci upoutané biomasy na nosičích. Masivní kolonizace povrchu nosiče probíhá v období 14 – 60. dne kultivace, rychlost nárůstu je cca. 23 kolonií/den. Křivka počtu kolonií od 60. dne kultivace klesá, v tomto čase již dochází ke shlukování biofilmu ve větší celky (rychlost poklesu je cca. 7 kolonií/den). Od 60. dne lze hovořit o tom, že se biofilm dostal do fáze vyspělosti (tzv. dospělý biofilm, dle kapitoly 1.5 teoretické části práce, La Motta 1980), biofilm se stává kompaktnějším a celistvějším.

Nanovláknový nosič typu 100 dtex dosahuje na počátku experimentu celkového počtu 210 kolonií, pro nanovláknový nosič typu 50 dtex je počet kolonií téměř dvojnásobný (380 kolonií). Rozdíl lze vysvětlit vysokou mírou sorpce přítomného kontaminantu na více povrstvený nanovláknový materiál s hodnotou 100 dtex (ve shodě s měřením dle kapitoly 2.2.2 d, a dle kapitoly 2.2.3), čímž lze vysvětlit nižší tendenci upoutávání mikroorganismů k tomu povrchu z důvodu vysoké koncentrace fenolů (obecně polutantů), což může působit inhibičně. Počet kolonií, na nanovláknovém nosiči, je až čtyřikrát vyšší než na komerčním nosiči. Výrazný rozdíl je způsoben různou morfologií a hydrofobitou povrchu nanovláken. Nanovlákná poskytují pro bakterie mnohem stabilnější a strukturně zajímavější povrch než je tomu u komerčního nosiče. Buňky na nanovlákná usedají prakticky okamžitě a ihned vytvářejí plošně a objemově větší celky. Počet kolonií je druhý den velice vysoký a s časem počet pouze klesá. Do 14. dne klesá počet kolonií rychlostí cca 24 kolonií/den, v období 14-56. den rychlostí 2 kolonie/den, po 56. dni kolonizace klesá počet kolonií rychlostí cca. 0.65 kolonie/den. Nanovlákná umožňují mikroorganismům tvorbu homogenního pokryvu na jejich povrchu. Biofilm nejprve kolonizuje místa s nanovláknem, postupně se však rozrůstá i na místa bez nanovláken, proto křivka osídlování povrchu mírně osciluje. Počet objektů (kolonií) se v závěru tohoto experimentu ustálí na čísle 30 (obecně by počet kolonií klesl k hodnotě 1).

Výsledek hodnocení počtu objektů na povrchu nosiče potvrzuje, že rozdílný typ pokladového materiálu (nosiče) má významný vliv na upoutávání mikroorganismů (především v počátku kultivace).



Obrázek 144 – Obrazová analýza – Počet objektů

Tabulka 11 – Změny rychlosti počtu objektů na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)

(rozsah dnů)	0 – 14	14 – 60	60 – 120
AnoxKaldnes [počet/den]	+5	+23	-7
Nanovlákn [počet/den]	-24	-2	-0.65

2) Plošné zaplnění nosiče (plošná porozita nosiče)

Parametr plošné zaplnění nosiče odráží celkový charakter růstu bakteriální populace na daném typu povrchu. Dle (Tijhuis et al. 1994a, Bishop et al. 1995) lze předpokládat, že křivka plošného zaplnění bude mít rostoucí tendenci. Rychlost a stabilita pokryvu je závislá na charakteru podkladu, buněčné populaci a na typu a charakteru bioreaktoru.

Konstantní průběh počtu objektů pro nosič AnoxKaldnes koreluje s konstantním průběhem plošného zaplnění. V průběhu prvních 14 dnů nedochází k výraznějšímu obsazování nosiče, což potvrzuje domněnku nutnosti prvotní transformace (úpravy) povrchu nosiče AnoxKaldnes. Jedná se o fázi vytváření primárního biofilmu (14 – 60. dnů), resp. reverzibilní adsorpce (což je ve shodě dle La Motta 1980). K nejrychlejšímu zaplňování povrchu nosiče dochází až po 60. dni kolonizace, vznik sekundárního biofilmu je o poznání rychlejší. Důvodem je snadnější přilnutí buněk k již vytvořené vrstvě primárního biofilmu. Počet kolonií v tomto čase klesá (po 60. dni) a zároveň obsazovaná plocha roste (dle La Motta 1980 tzv. permanentní zachycení), dochází ke spojování kolonií biofilmu do větších celků. Jelikož spojené kolonie jsou schopny biomasy produkovat rychleji než separované jednotlivé menší kolonie, je křivka po 60. dnu kultivace strmější (křivka AnoxKaldnes v grafu na obrázku 145 níže a dle tabulky 12 níže). Rychlost pokrývání povrchu nosiče AnoxKaldnes se v průběhu času mění (viz tabulka 12 níže), zpočátku rychlost pokryvu roste 0.1 [% povrchu nosiče/den], po 60. dni kultivace rychlost pokryvu roste strměji 0.3, 0.4 až k hodnotě 0.9 [% povrchu nosiče/den] (v závěru experimentu). Přesto je nosič AnoxKaldnes téměř dvakrát pomaleji kolonizován než nanovláknový nosič. V závěru kolonizace pokrývá biofilm cca 40 % povrchu nosiče. Tendence růstu křivek (způsob průběhu) parametru plošného zaplnění je pro nosič AnoxKaldnes ve shodě s literaturou dle (Peyton 1996, pro nízkou míru zatížení substrátem).

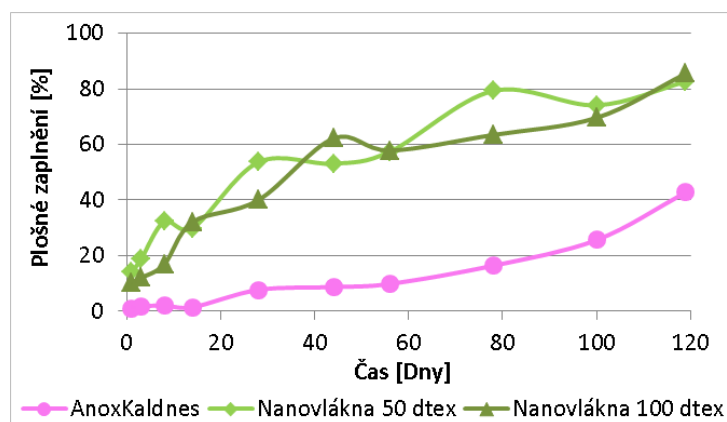
Pro nanovláknový nosič počet objektů od počátku výrazně klesá (obrázek 144), což koreluje s výrazným nárůstem plošného zaplnění (obrázek 145). Nárůst křivky plošného zaplnění je strmější oproti komerčnímu nosiči, což je měřítkem rychlejší kolonizace na povrchu nanovláknového nosiče

v důsledku vhodnější adhesivity buněk k nanovláknennému povrchu. Rychlost pokrývání povrchu nosiče se v průběhu času mění, zpočátku je hodnota rovna 2.5 [% povrchu nosiče/den], dále rychlost pokryvu mírně klesá 2.1, 1.0, v závěru experimentu je rychlost kolonizace 0.5 [% povrchu nosiče/den]. Díky struktuře a výjimečným vlastnostem povrchu navíc nedochází k žádnému zpoždění počáteční kolonizace, biofilm se vytváří téměř ihned, primární a sekundární biofilm se vytváří zároveň. Tento závěr je v nesouladu dle (La Motta 1980); pro nanovláknenný nosič není nutná tvorba primárního biofilmu, díky struktuře nanovláknenného pokryvu dochází ihned k procesu permanentního zachycení. Ve 120.den kolonizace pokrývá biofilm více než 80 % povrchu nosiče, míra pokrytí nanovláknenného nosiče je dvakrát vyšší než pro komerční nosič. Tendence růstu křivek (způsob průběhu) parametru plošné zaplnění není pro nanovláknenný nosič ve shodě s literaturou dle (Peyton 1996), především v počátku experimentu, pravděpodobně díky využití nanovláknenných struktur, které zajišťují speciální morfologii povrchu.

Po určité době se rychlost růstu biofilmu zpomalí a tloušťka biofilmu dosahuje určité ustálené hodnoty dle (La Motta 1980). Tento závěr v průběhu 120 dní experimentu pozorován nebyl, pravděpodobně z důvodu krátkého časového úseku pozorování.

Tabulka 12 – Změny rychlosti plošného zaplnění na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)

(rozsah dnů)	0 – 14	14 – 56	56 – 78	78 – 100	100 – 120
AnoxKaldnes [%/den]	+0.1	+0.2	+0.3	+0.4	+0.9
Nanovláknna [%/den]	+2.5	+2.1	+1.0	+0.2	+0.5



Obrazek 145 – Obrazová analýza – Plošné zaplnění

Vliv povrchové struktury na stabilitu biofilmu byla předmětem různých studií (Mulder and Heijnen 1988; Heijnen et al. 1992). Tyto studie ukazují, že drsnost povrchu nosiče zlepšuje rozvoj biofilmu, výsledky předkládané disertační práce tyto závěry potvrzují. Stejně tak domněnka, že drsnost povrchu je dominantním faktorem pro růst biofilmu, a to více než fyzikálně-chemické vlastnosti daného povrchu dle (Loosdrecht et al. 1988) byly v souladu s naměřenými výsledky.

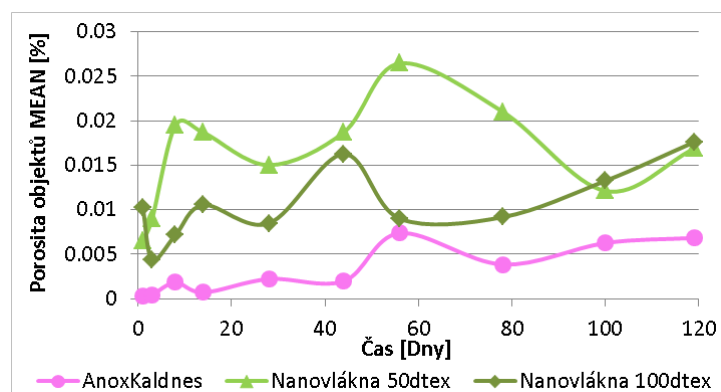
Význam drsnosti povrchu nosiče je ovlivněn specifickými podmínkami reaktoru; pro více drsné nanovláknenné nosiče neexistuje žádný teplotní vliv. Obecně pro hladké nosiče AnoxKaldnes dochází k tvorbě biofilmu pouze při vyšších teplotách (nebo je kolonizace a růst biofilmu pomalejší), což vede k relativně silnějšímu účinku střižných sil na biofilm (Loosdrecht et al. 1995; Brent and Peyton, 1996). Bakterie kolonizují raději hrubé povrchy, protože zde působí menší smykové síly a samotný povrch substrátu přepočítaný na jednotku plochy je vyšší (Donlan 2002).

3) Porozita objektu a Eulerovo číslo

Biofilmy jsou často nejednotné a nehomogenní, jsou plné děr a kanálů napojených na velké množství tekutiny, která biofilmem protéká (Deeber et al, 1994; Stoodley et al, 1994). Parametr porozita objektu určuje celistvost, resp. homogenitu identifikovaných objektů v obraze. Parametr dokáže odhalit přítomnost dutin či kanálků v objektech. Je-li porozita objektu rovna 0, je objekt zcela homogenní, bez dutin. Zvyšující se hodnoty porozity objektů jsou měřítkem zvyšující se heterogenity biofilmu, resp. pravděpodobnost výskytu dutin a kanálků v biofilmu je vyšší.

Pro nosič AnoxKaldnes dle grafu na *obrázku 146* platí, že počáteční kolonie jsou zcela kompaktní (porozita je rovna nebo blízká hodnotě 0). Daný výsledek lze předpokládat, jelikož zpočátku se tvoří velice malé kolonie, u nichž se porozita nepředpokládá (dle Hermanowicz et al. 1995; de Beer et al., 1994). S časem, jelikož se velikost kolonií zvyšuje, zvyšuje se také porozita objektů (ve shodě dle Deeber et al, 1994; Stoodley et al, 1994). Průměrná hodnota porozity u nosiče AnoxKaldnes je na konci experimentu rovna 0.007 %, maximální hodnota porozity je 0.3 %, přesto více než 50 % objektů má porozitu blízkou hodnotě 0 %.

Pro nanovláknový nosič lze z grafu na *obrázku 146* pozorovat, že již počáteční kolonie nejsou zcela kompaktní (porozita je rovna 0.005 %). Jelikož nanovlákná mají charakteristickou morfologii povrchu, vytvářejí se zde objekty, jejichž porozita je již od počátku experimentu vyšší než u komerčního nosiče. Časem, s rostoucí velikostí kolonie, se porozita objektů mírně zvyšuje. Průměrná hodnota porozity u nanovláknového nosiče je na konci experimentu rovna 0.018 %, maximální hodnota porozity je 0.3 %, přesto i zde více než 50 % objektů má porozitu blízkou hodnotě 0 %. Porozita nanovláknových nosičů je v průměru 2.6x vyšší než je tomu u komerčního nosiče.

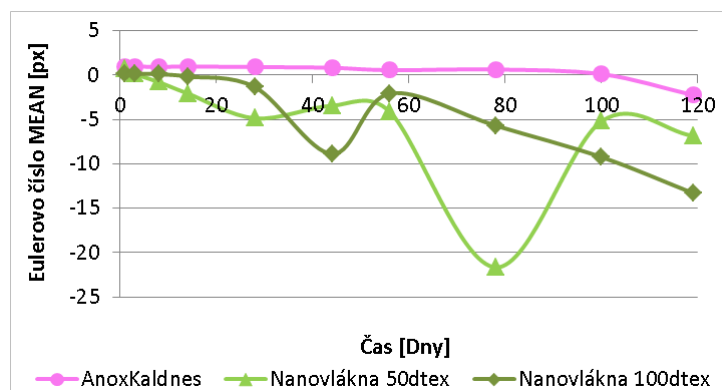


Obrazek 146 – Obrazová analýza – Porozita objektů

V předkládané disertační práci bylo pro hodnocení Eulerova čísla zavedeno následující stanovisko. Počet objektů v dané oblasti je roven jedné (hodnocení Eulerova čísla probíhá pro každý objekt zvlášť). Hodnoty Eulerova čísla jsou tak „prostým“ vyjádřením počtu pórů v daném objektu ($Eulerovo\ číslo = \{1 - počet\ pórů\}$). Výsledný graf (*obrázek 147* uvedený níže) uvádí, že ačkoli se na nanovláknovém nosiči vytvářejí plošně větší kolonie biofilmu (doloženo dále v bodě 5) existují v těchto koloniích mikro póry, jejichž velikost se sice s časem příliš nemění (viz *obrázek 146* výše), ale počet mikro-pórů s časem postupně roste (resp. Eulerovo číslo klesá). Pro nanovláknový nosič je průměrný počet dutin v závěru experimentu cca. 10 (maximální počet dutin v závěru experimentu je 800), pro nosič AnoxKaldnes je počet dutin v závěru experimentu cca. 3 (maximální počet dutin v závěru experimentu je 240). Výsledkem je potvrzení, že nanovláknové struktury a z nich připravené nosiče umožňují biofilmu vytvářet takové struktury, v nichž existují dutiny do maximální velikosti

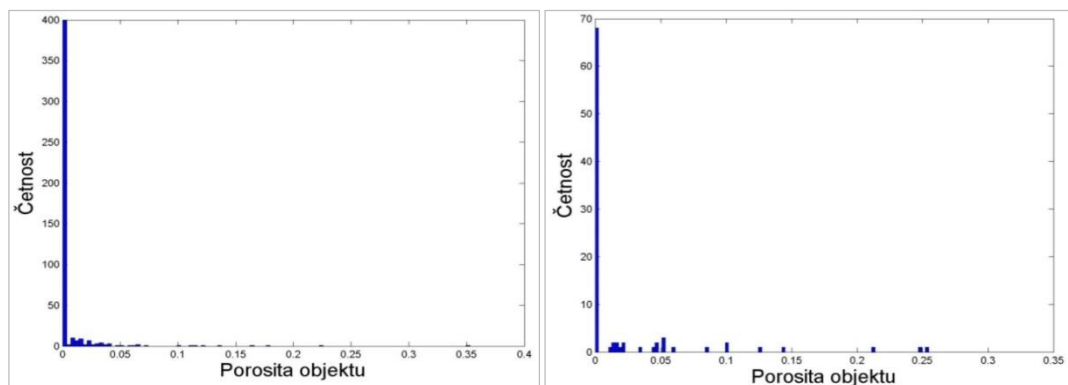
0.03 % velikosti kolonie, a počet těchto dutin je se zvětšující se kolonií a v čase postupně rostoucí. Navíc v porovnání s komerčním plastovým nosičem AnoxKaldnes je počet dutin u nanovláknenného nosiče cca. 3x vyšší, což je pro růst a zachování aktivního biofilmu prvořadým cílem.

Minimální hodnoty Eulerova čísla (pro oba nosiče) je rovna 0 (tj. v objektech se nenalézají žádné dutiny). Více než 50 % všech objektů pro oba nosiče dosahuje Eulerova čísla blízké hodnotě 1 (tj. minimálně 99 % identifikovaných objektů obsahuje v biofilmu alespoň jednu dutinu).



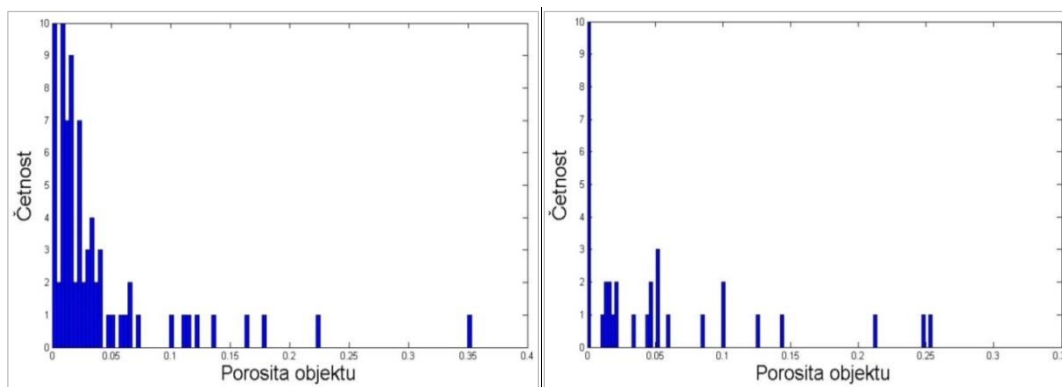
Obrázek 147 – Obrazová analýza – Eulerovo číslo objektů (průměr)

Graf rozložení hodnot porozity objektů na povrchu nosičů dokládají následující histogramy (jednotkami na ose-x jsou procenta), které byly vyneseny pro objekty ve 120. den kultivace. Charakter histogramů byly shodné po celou dobu kultivace. Typ rozdělení nelze přesně definovat, jelikož jak lze vidět, v obraze existuje velké množství objektů, ale jen 25 % z nich je více porézních (obsahují více než jednu dutinu). Výsledkem je, že až 75 % objektů, u obou nosičů, neobsahuje póry (kolonie jsou celistvé bez vnitřních kanálků či dutin nebo je počet dutin roven 1). Důkaz je uveden na histogramech níže.



Obrázek 148 – Obrazová analýza – Histogram hodnot porozity objektů

Pokud vyneseme histogram rozložení hodnot porozity objektů na povrchu nosičů bez objektů neobsahujících póry (tj. bez prvního sloupce četnosti v obraze výše) získáme následující graf (obrázek 149).



Obrázek 149 – Obrazová analýza – Histogram hodnot porozity objektů (detail)

4) Obvod

Parametr obvod objektu určuje do jisté míry hladkost identifikovaných objektů v obraze. Pokud parametr obvod má podobnou tendenci (růstu nebo poklesu) jako parametr obsah kolonií, pak lze kolonie označit za hladké; okraje těchto kolonií jsou homogenní a neobsahují žádné výčnělky, nebo jen velice málo. Jelikož se v bioreaktoru vykytují střížné síly, což je parametr s největším vlivem na formování povrchu biofilmu, předpokládá se, že obvod i obsah bude mít stejnou tendenci růstu jako parametr plošného zaplnění nosiče.

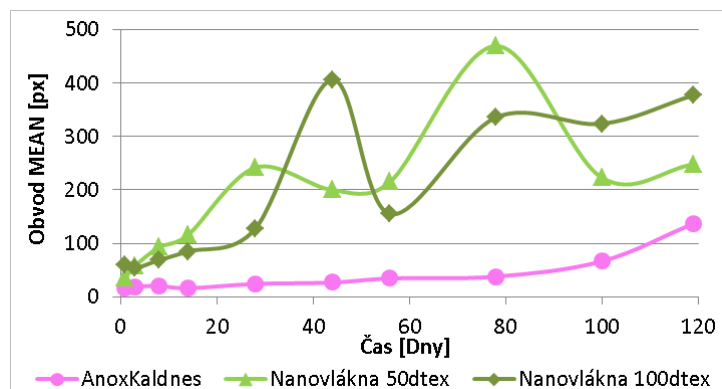
Pro komerční nosič AnoxKaldnes platí následující závěry. Minimální obvod dosahoval hodnot 9 pixelů, což odpovídá 26.4 μm . Více než 50 % objektů má obvod v rozmezí hodnot 12 – 20 pixelů (35.2 – 58.7 μm). V průběhu prvních 60 dnů se hodnoty obvodu nijak výrazně nemění, po 60. dni kultivace obvod výrazně roste, což koresponduje s výsledky plošného zaplnění nosiče (bod 2). Křivka obvodu roste výrazněji na konci kultivace. Rychlost růstu obvodu je do 60. dne postupně klesající, od 60. dne kultivace je rychlost růstu obvodu postupně rostoucí (dle tabulky 13). V závěru experimentu je zrychlení růstu obvodu objektů rovno 2.8 ($= 3.7 / 1.3$) [pixelů/den²].

Tabulka 13 – Změny obvodu objektů na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)

(rozsah dnů)	0 – 14	14 – 56	56 – 78	78 – 100	100 – 120
AnoxKaldnes [pixelů/den]	+0.7	+0.5	+0.2	+1.3	+3.7
Nanovláknina [pixelů/den]	+7.3	+4.3	+11.6	-11.2	+1.3

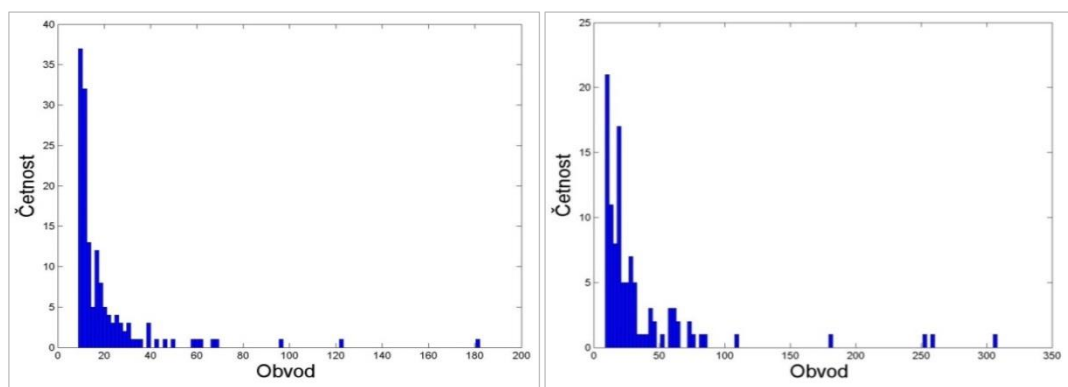
Pro nanovláknenný nosič minimální obvod dosahoval hodnot 9 pixelů, což odpovídá 26.4 μm . Více než 50 % objektů má obvod v rozmezí hodnot 12 – 25 pixelů (35.2 – 73.34 μm). Dále lze vidět, že křivky růstu obvodu se výrazně urychlí mezi 14. a 28. dnem kultivace a následně se již nijak výrazně nemění (nebereme-li v úvahu oscilace). Výsledek se shoduje s výsledky měření plošného zaplnění nosiče (bod 2). Jelikož se hodnoty obvodu kolonií pro nano-vláknenný nosič výrazně nemění, lze usuzovat, že biofilm se vyvíjí morfologicky homogenní (kolonie neobsahují výčnělky, povrch je hladký), což se shoduje s výsledkem parametru fraktální dimenze (dle bodu 9). Tento závěr je logický, neboť u nanovláknenného nosiče narůstá biofilm na povrchu vláken, kde je přímo vystaven podmínkám okolní kapaliny. Typ nosiče, typ reaktoru a především střížné síly formují strukturu biofilmu, což se shoduje s odbornou literaturou dle (Loosdrecht et al. 1995, Gjaltema et al. 1994; Brent and Peyton, 1996). Průměrné hodnoty obvodu kolonií na nanovláknenném nosiči jsou vyšší než průměrné hodnoty

obvodu kolonií na komerčním nosiči (dle *obrázku 150*). Nanovláknenný nosič díky své specifické morfologii povrchu umožňuje vývoj plošně i prostorově větších celků biofilmu a podporuje jeho udržení a stabilitu při dalším rozvoji.



Obrázek 150 – Obrazová analýza – Obvod objektů (průměr)

Graf rozložení hodnot obvodu objektů na povrchu nosičů dokládají následující histogramy (jednotkami na ose-x jsou pixely), které byly vyneseny pro objekty ve 120. den kultivace. Charakter histogramů byly shodné po celou dobu kultivace. Pro oba typy nosiče jde o exponenciální rozdělení.



Obrázek 151 – Obrazová analýza – Histogram hodnot obvodu objektů

5) Obsah

K charakterizaci morfologie biofilmu a jeho vnitřní struktury používají mnozí vědci termíny jako „kanálky, chlupatost, hrubost, hladkost“ k popisu morfologie biofilmu (Christensen, 1989; Bremer et al., 1992; Cao and Alaerts, 1995; Eighmy et al., 1983; Kugaprasatham et al., 1992; Lewandowski and Welser, 1991; Massoldeya et al., 1995; Siegrist and Gujer, 1985; Zahid and Ganczarczyk, 1994; Zhang and Bishop, 1994). Právě v korelaci křivek parametru obvod a obsah lze do jisté míry identifikovat hladkost identifikovaných objektů v obraze. Pokud parametr obvod má podobnou tendenci (růstu nebo poklesu) jako parametr obsah, pak lze kolonie označit za hladké, okraje těchto kolonií jsou homogenní a neobsahují žádné výčnělky, nebo jen velice málo. Jelikož se v bioreaktoru vykytují střížné síly, které mají největší vliv na formování povrchu biofilmu, předpokládá se, že obvod i obsah bude mít stejnou tendenci růstu jako parametr plošného zaplnění nosiče.

Pro komerční nosič AnoxKaldnes platí následující závěry. Minimální obsah kolonií dosahoval hodnot 6 pixelů², což odpovídá 51.6 μm². Více než 50 % objektů má obsah v rozmezí hodnot 15 – 25 pixelů²

(129 – 215 μm^2). Trend křivky obsahu koresponduje s trendem křivky obvodu (zvláště pro hodnocení maximálních hodnot a průměrných hodnot). V závěru experimentu se hodnoty obvodu objektů zvětšují rychlostí 3.7 [pixelů/den]. Hodnoty obsahu objektů se zvětšují rychlostí 12.6 [pixelů²/den]. Křivka obsahu roste až 3.4x (= 12.6 / 3.7) rychleji než křivka obvodu (pro průměrné hodnoty dle *obrázku 152*). Pokud obsah roste rychleji než obvod, je výsledkem vytváření morfologicky homogenních kolonií (obsahující málo výčnělků, povrch a okraj kolonií je hladký).

Tabulka 14 – Změny obsahu objektů na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)

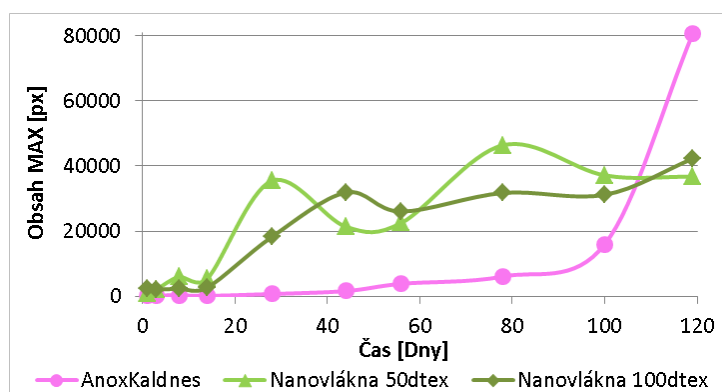
(rozsah dnů)	0 – 14	14 – 56	56 – 78	78 – 100	100 – 120	...	78 – 120
AnoxKaldnes [pixelů ² /den]	+0.7	+0.6	+0.6	+3.1	+12.6		+21
Nanovlákná [pixelů ² /den]	+13.4	+21.6	+50.1	-21.4	+32.1		+0.6

Tabulka 15 – Změny obvodu objektů na nosičích (hodnoceno z průměrných hodnot)

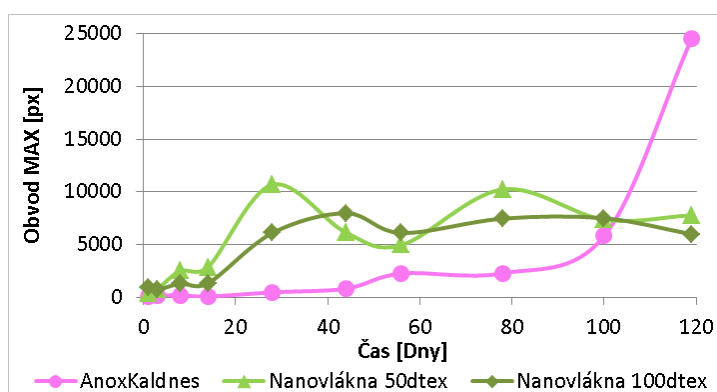
(rozsah dnů)	0 – 14	14 – 56	56 – 78	78 – 100	100 – 120	...	78 – 120
AnoxKaldnes [pixelů/den]	+0.7	+0.5	+0.2	+1.3	+3.7		+18.5
Nanovlákná [pixelů/den]	+7.3	+4.3	+11.6	-11.2	+1.3		+0.1

Pro nanovláknenný nosič platí následující závěry. Minimální obsah kolonií dosahoval hodnot 6 pixelů², což odpovídá 51.6 μm^2 . Více než 50 % objektů má obsah v rozmezí hodnot 15 – 33 pixelů² (129 – 284 μm^2). Trendy křivek obsahů korespondují s trendy křivek obvodů (zvláště pro hodnoty průměrné a maximální). Trend křivky obsahu koresponduje s trendem křivky obvodu, s rozdílem, že pro nanovláknenný nosič není křivka konstantní jako pro parametr obvodu, ale je postupně rostoucí. V závěru experimentu se hodnoty obvodu objektů zvětšují rychlostí 1.3 [pixelů/den]. Hodnoty obsahu objektů se zvětšují rychlostí 32.1 [pixelů²/den]. Křivka obsahu roste 24.7x (= 32.1 / 1.3) rychleji než křivka obvodu (pro průměrné hodnoty dle *obrázku 154*). Pokud obsah kolonií roste rychleji než obvod, je výsledkem vytváření morfologicky velice homogenních kolonií (neobsahující výčnělky, dutiny, povrch a okraj kolonií je hladký). Jelikož poměr růstu obsahu a obvodu je pro nanovláknenný nosič vyšší (24.7 nanovláknenný nosič, 3.4 AnoxKaldnes nosič), a to dokonce více jak 7x lze vyslovit domněnku, že biofilm vytvářený na nanovláknenném nosiči je hladší oproti biofilmu vytvářeném na AnoxKaldnes nosiči. Tento závěr je logický, neboť u nosiče AnoxKaldnes narůstá biofilm na vnitřním žebroví, kde je dobře chráněn před prouděním okolní kapaliny. Nižší míra střížných sil v těchto místech dovoluje tvorbu o něco více morfologicky rozmanitého biofilmu (biofilm je sice více rozmanitý než biofilm vytvářený na nanovláknenném nosiči, ale přesto neobsahuje výčnělky). Výsledek se shoduje s odbornou literaturou dle (Loosdrecht et al. 1995).

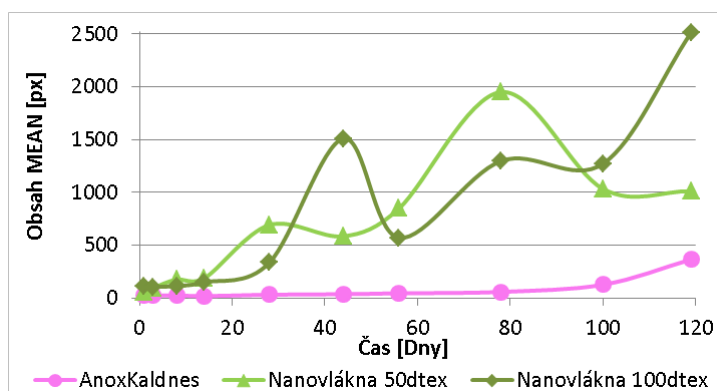
Navíc z průměrných hodnot obsahů, které se v závěru experimentu příliš nemění (*obrázek 154*) a z maximálních hodnot obsahu, které v závěru experimentu rychle rostou (*obrázek 153*) lze vyvodit závěr, že ačkoli se časem formují velké kolonie (hodnoty maxima se prudce zvyšují), stále dochází k tvorbě nových mikro-kolonií, jejichž počet je výrazně vyšší, proto jsou průměrné hodnoty obsahu kolonií jen mírně rostoucí. Tento závěr platí pro oba typy nosičů a potvrzují jej výsledky uvedené v histogramech (*obrázek 156*), velké objekty sice existují, ale jejich počet je nízký.



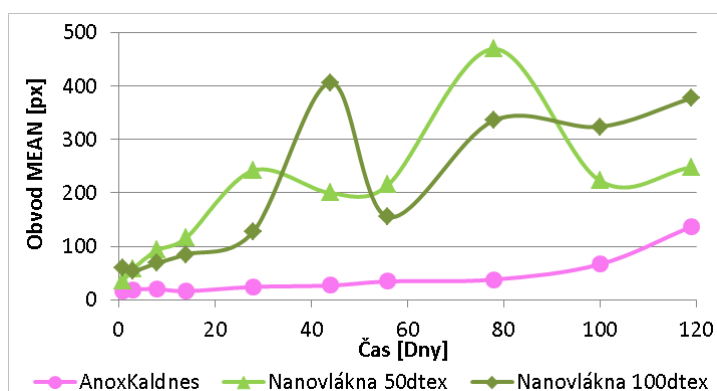
Obrázek 152 – Obrazová analýza – Obsah objektů (maximum)



Obrázek 153 – Obrazová analýza – Obvod objektů (maximum)

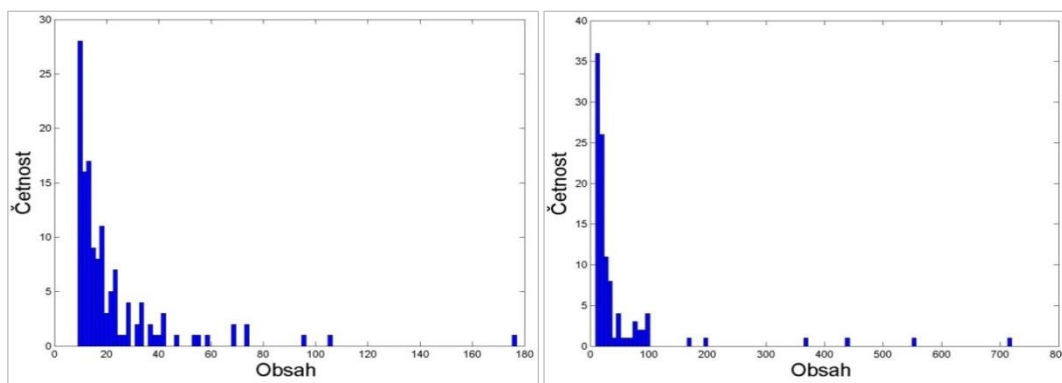


Obrázek 154 – Obrazová analýza – Obsah objektů (průměr)



Obrázek 155 – Obrazová analýza – Obvod objektů (průměr)

Graf rozložení velikosti obsahu objektů na povrchu nosičů dokládají následující histogramy (jednotkami na ose-x jsou pixely²), které byly vyneseny pro objekty ve 120. den kultivace. Charakter histogramů byly shodné po celou dobu kultivace. V obou případech, pro oba typy nosičů, se jedná o exponenciální rozdělení.

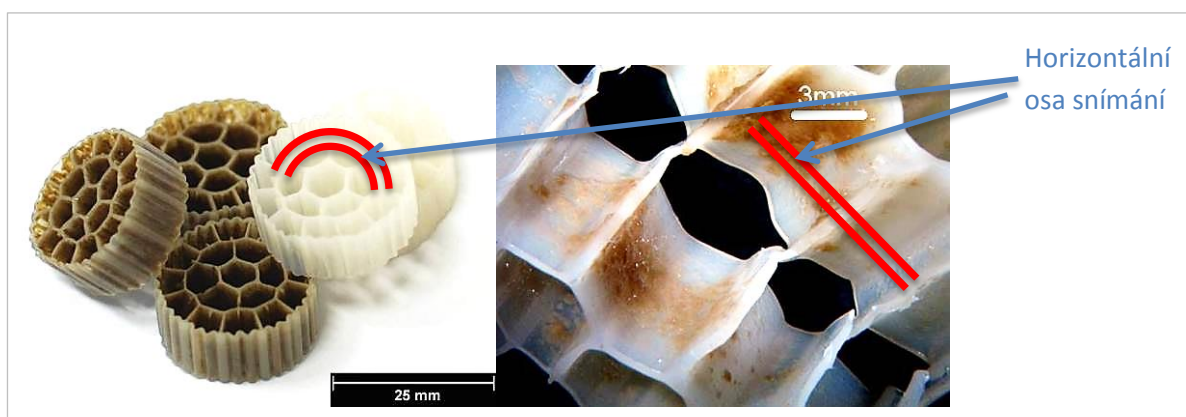


Obrázek 156 – Obrazová analýza – Histogram hodnot obsahu objektů

6) Orientace

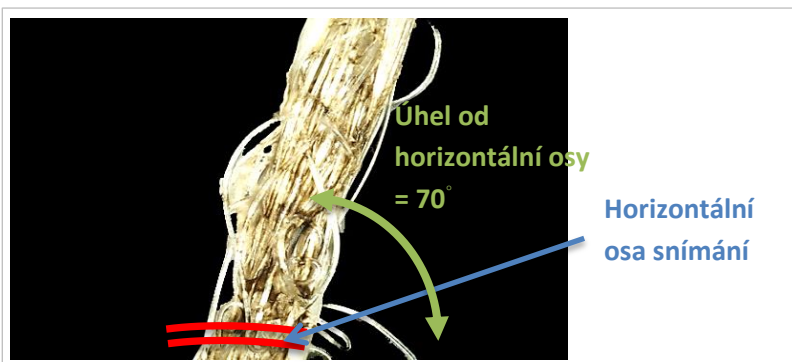
Orientace objektů v obraze je úhel mezi osou-x a hlavní osou detekovaného objektu. Hodnoty $+90^\circ$ a -90° odpovídají vertikálně orientovanému objektu, hodnoty kolem 0° odpovídají horizontálně orientovanému objektu. Na základě předchozího hodnocení, kdy bylo prokázáno, že biofilm na komerčním nosiči AnoxKaldnes dorůstá spíše kruhovitých útvarů, předpokládáme, že orientace těchto kolonií bude velice blízká hodnotě 0° . Pro nanovláknenné nosiče bylo dle hodnocení parametru horizontální a vertikální běhové délky prokázán preferenční růst kolonií ve svislém směru. Cílem hodnocení parametru orientace je prokázat, zda kolonie (rostoucí na nanovláknenném nosiči) rostou skutečně podél nanovláknenných struktur (hodnoty orientace budou rovné hodnotě orientace nosiče) či nikoli (hodnoty nebudou rovné orientaci nosiče).

Dle grafu níže (obrázek 157) lze vidět, že na nosiči AnoxKaldnes se orientace kolonií pohybují mezi úhly -10° až $+10^\circ$. Jelikož průměrná orientace identifikovaných objektů na nosiči AnoxKaldnes je cca 0° a více než 50 % identifikovaných objektů má úhel do 10° , lze vyslovit závěr, že kolonie narůstají buď kruhovitě (orientace kruhovitých objektů je rovna 0°), nebo narůstají podél horizontální osy snímání. Horizontální osa snímání je znázorněna na obrázku níže červenou linkou.

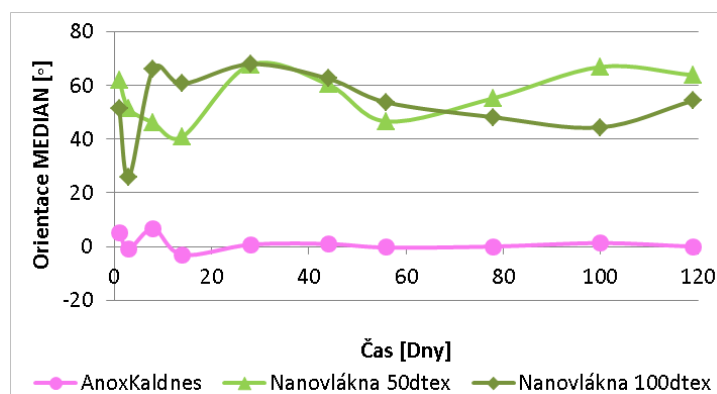


Obrázek 157 – Návrh horizontální osy snímání u AnoxKaldnes nosiče

Dle grafu níže (obrázek 158) lze vidět, že na nanovláknenném nosiči se orientace kolonií pohybuje v průměru mezi úhly 40° až 70°. Přítomnost kruhovitých objektů, může parametr orientace ovlivňovat, výsledkem je oscilace křivek v grafu. Jelikož průměrná orientace identifikovaných objektů na nanovláknenném nosiči je cca 60° a více než 50 % identifikovaných objektů má úhel do 70° (tj. více než 50 % objektů je protáhlého tvaru), lze vyslovit závěr, že kolonie narůstají podél hlavní osy vlákna. Osa vlákna je znázorněna na obrázku níže červenou linkou. Jelikož vlákno bylo snímáno v úhlu cca 70° (vůči horizontální ose snímání), plyne z toho závěr, že kolonie narůstají po směru nanovláknenných vrstev (podél podložní nitě).



Obrázek 158 – Nákres horizontální osy snímání u nanovláknenného nosiče



Obrázek 159 – Obrazová analýza – Orientace

7) Kruhovitost

Kruhovitost je parametr, který naznačuje v jaké míře je určitý objekt podoben kruhu, objekty rovné 1 jsou objekty, které lze aproximovat kruhem, objekty blízké hodnotě 0 jsou objekty eliptické (osově protáhlé).

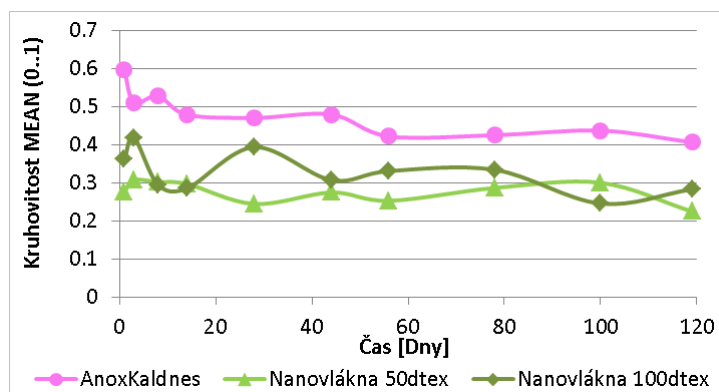
$Kruhovitost = \frac{4 \cdot Obsah}{\pi \cdot Délka^2}$, kde parametr „délka“ je aproximován délkou hlavní osy daného objektu (viz obrázek 24).

Dle grafu níže (obrázek 160) lze vidět, že na nosiči AnoxKaldnes se více kruhové kolonie formují spíše v počátku kultivace, postupem času (vlivem střižných sil na povrch biofilmu) se formují kolonie mírně protáhlé (dle bodu 6 jsou kolonie protáhlejší v horizontálním směru), což je ve shodě s literaturou dle (Loosdrecht et al. 1995). Průměrná kruhovitost u nosiče AnoxKaldnes je v průběhu experimentu rovna 0.5, maximální hodnota kruhovitosti je 1, více než 50 % objektů má kruhovitost

rovnou 0.5. Kolonie formující se na nosiči AnoxKaldnes jsou z počátku kultivace více kruhovitější než na konci kultivace, což je v důsledku působení střižných sil na mohutnější biofilm vcelku logický závěr.

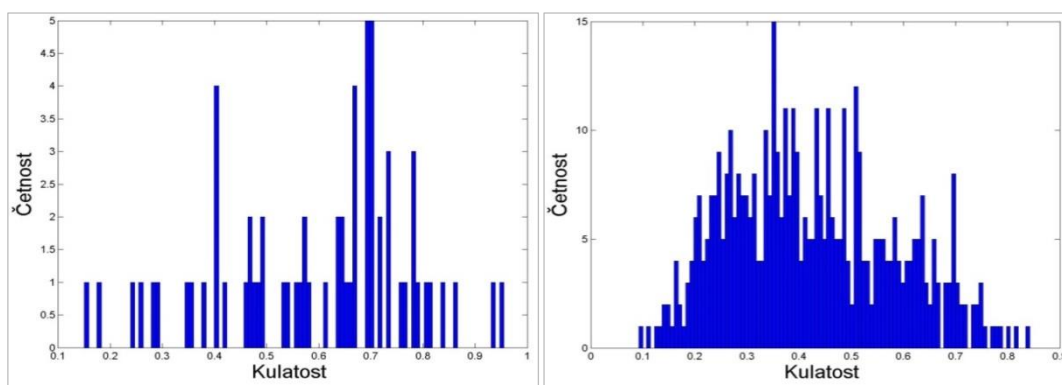
Pro nanovláknenný nosič je patrné, že již od počátku se formují kolonie, které jsou protáhlejší (dle hodnocení parametru orientace z bodu 6 jsou kolonie protáhlé podél vlákna). Tato skutečnost platí po celou dobu experimentu, osová protáhlost objektů se s časem velice mírně zvyšuje (křivka kruhovitosti s časem mírně klesá). Zvyšování protáhlosti kolonií podél nanovláknenných struktur zajišťuje biofilmu vyšší stabilitu, především proti střižným silám v reaktoru, jelikož biofilmové struktury mají vyšší styčný povrch k těmto strukturám. Daný výsledek bohužel s literaturou porovnat nelze, protože podobné výsledky nebyly doposud publikovány. Průměrná kruhovitost u nanovláknenného nosiče je v průběhu experimentu rovna 0.3, maximální hodnota kruhovitosti je 0.8, více než 50 % objektů má kruhovitost rovnou 0.3.

Nevýhodou při hodnocení kruhovitosti je, že při výpočtu jsou zahrnovány malé objekty, které bohužel do hodnocení vnášejí velkou chybu. V současné době jsou ze sady dat eliminovány malé objekty pouze do velikosti kolonie $51.6 \mu\text{m}^2$ (6 px²). Pokud bychom kruhovitost počítali pro objekty mnohem větší než daná konstanta, pak by strmost křivek byla výraznější.



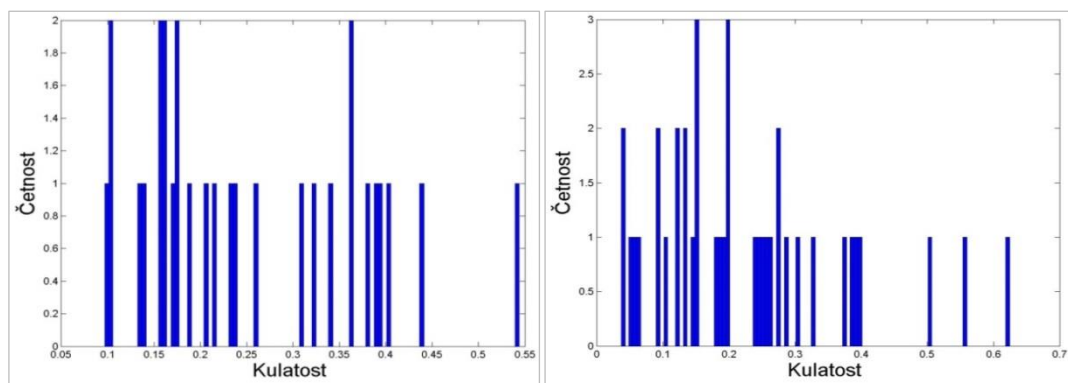
Obrázek 160 – Obrazová analýza – Kruhovitost

Graf rozložení kruhovitosti objektů na povrchu nosičů dokládají následující histogramy (jednotkami na ose-x je rozmezí 0..1). Na počátku experimentu se na nosiči AnoxKaldnes formují objekty s Rovnoměrným rozložením (1 – 28.den experimentu), na konci experimentu jde již o Normální rozložení (44 – 119.den experimentu). Kolonie na nosiči AnoxKaldnes se do formy pravidelných kulovitých útvarů formují spíše jen v počátku experimentu, postupně s časem, podle míry působení okolních podmínek, se utvářejí spíše objekty mírně protáhlejší.



Obrázek 161 – Obrazová analýza – Histogram hodnot kruhovitosti objektů na nosiči AnoxKaldnes

Během celého experimentu se na nanovlákněném nosiči formují objekty s Rovnoměrným rozložením. Kolonie na nanovlákněném nosiči vytvářejí v převážné většině objekty osově protáhlé (eliptické, parametr kruhovitosti se pohybuje do hodnoty 0.6). Vytvářené kolonie odpovídají směrovosti nanovlákněných struktur (podél směru nanovláken).



Obrázek 162 – Obrazová analýza – Histogram hodnot kruhovitosti objektů na nanovlákněném nosiči

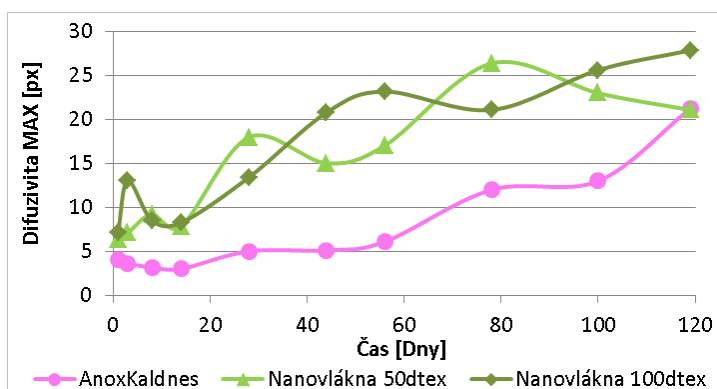
8) Difuzní vzdálenost

Difuzní vzdálenost je ukazatelem vzdálenosti (v pixelech či mikrometrech), kterou musí substrát (nebo např. rozpuštěný kyslík apod.) urazit z vodního prostředí (z okraje kolonie, biofilmu) do středu kolonie. Parametr difuzní vzdálenosti identifikuje oblasti (v obraze) nebo časové období (v křivce grafu), kdy může nastávat difuzní limitace způsobená nedostatečným prostupem živin skrze biofilm například v důsledku nedostatečného množství kanálků v biofilmu, nebo v důsledku vysoké mohutnosti biofilmu (vrstva aktivního biofilmu může být omezena a celý mechanismus biologického čištění může být limitován). Jelikož biofilm se v čase zvětšuje plošně i prostorově, předpokládá se, že difuzní limitace také poroste. Ovšem je nutné zdůraznit, že zde prezentované výsledky jsou relevantní pouze pro hodnocení difuzní vzdálenosti pro 2D prostor (zanedbává se osa-z), reálně se však difuzivita předpokládá i v kolmém směru k nosiči (tj. 3D prostor), zde uvedené výsledky jsou platné pouze pro 2D hodnocení. 3D hodnocení, které by více odráželo skutečný systém, bude zformováno v navazujících pracích.

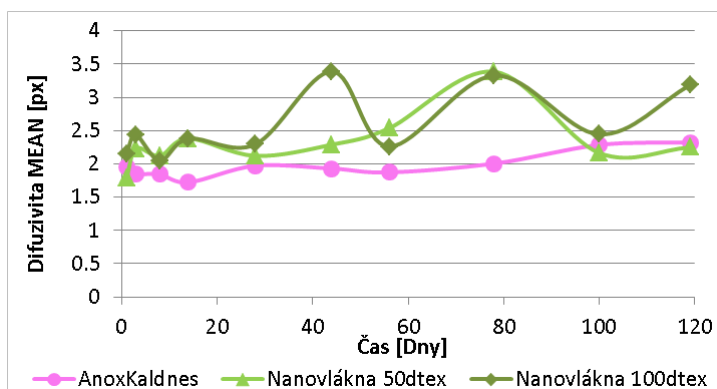
Průběh křivky maximální difuzní vzdálenosti pro nosič AnoxKaldnes je pozvolně rostoucí. Průběh křivky koresponduje s křivkami parametrů obvod, obsah, plošné zaplnění, tj. až po 60.dni kolonizace může docházet k tvorbě kolonií, u nichž může být difuzivita limitující, může docházet k tvorbě anaerobních zón. Trend maximální difuzní vzdálenosti pro tento typ nosiče plynule roste, na základě čehož lze usuzovat, že existující kolonie se neustále zvětšují (což potvrdilo měření dle bodu 5). Navíc podle výsledků průměrné difuzivity, která je téměř konstantní (resp. neklesající) plyne závěr, že se neustále vytváří nové mikro-kolonie (maximální hodnoty parametru rostou, avšak průměrné hodnoty jsou konstantní). Navíc více než 50 % všech objektů dosahuje difuzivity o velikosti 2 pixely. Minimální hodnota difuzivity pro nosič AnoxKaldnes je rovna 1 pixel, což odpovídá velikosti 2.933 μm .

Pro nanovlákněné nosiče se větší shluky tvoří rovnoměrně od počátku experimentu, maximální difuzní vzdálenost roste především na počátku kultivace (nejvýraznější nárůst je pozorován do 60.dne kultivace). Více než 50 % všech objektů dosahuje difuzivity o velikosti v rozmezí 1.5 – 2 pixely. Minimální hodnota difuzivity je pro nanovlákněný nosič rovna 1 pixel, což odpovídá velikosti 2.933 μm .

μm. Maximální difuzní vzdálenost v průběhu kultivace je pro nanovláknenný nosič, v porovnání s komerčním nosičem, výrazně vyšší, navzdory tomu lze díky parametru porozita objektu (bod 3) tvrdit, že kolonie jsou sice větší, ale díky tomu, že obsahují mnoho kanálků a dutin, nedochází k tvorbě neprostupných (anaerobních) zón, nebo je jejich tvorba minimální. Tento závěr dokládá průběh křivek průměrné difuzní vzdálenosti, kde nanovláknenný nosič dosahuje téměř shodných hodnot jako nosič AnoxKaldnes. Ačkoli se na nanovláknenném nosiči vytvářejí průměrně mnohem větší kolonie (bod 5), je průměrná difuzivita shodná s menšími koloniemi vytvářenými na nosiči AnoxKaldnes. Tento fakt je opět výsledkem přítomnosti nanovláknenných struktur, které poskytují na něm vytvářenému biofilmu zcela ojedinělé vlastnosti, které pomáhají eliminovat difuzní limitace. Ke vzniku anaerobních zón může docházet mnohem později, nebo dokonce vůbec (dle podmínek v bioreaktoru).



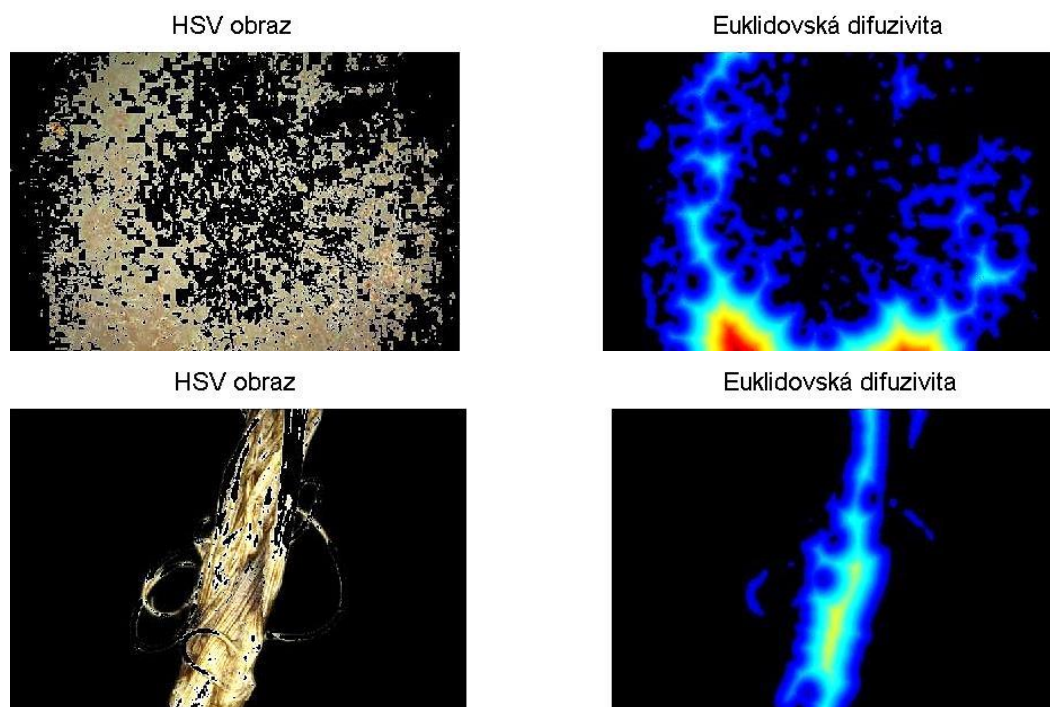
Obrázek 163 – Obrazová analýza – Difuzní vzdálenost (maximum)



Obrázek 164 – Obrazová analýza – Difuzní vzdálenost (průměr)

Výsledek měření difuzní vzdálenosti, převedený do obrazové podoby, je uveden na *obrázku 165* níže, obraz odpovídá měření ve 119. den kolonizace, tj. v závěru experimentu. Obraz vlevo je vstupním obrazem pro hodnocení maximální difuzní vzdálenosti (v obraze byly vyseparovány podložní nosiče, obraz obsahuje pouze detekovaný biofilm). Obraz vpravo je výsledek vyhodnocené difuzivity pomocí metod obrazové analýzy. Hodnoty odpovídající černému zbarvení odpovídají pozadí (nosiči), všechny ostatní barevné tóny odpovídají biofilmu. Hodnoty odpovídající modrému až tyrkysovému zbarvení je biofilm, v němž nedochází k difuzní limitaci (resp. limitace přenosu živin či kyslíku není nikterak omezoována). Hodnoty odpovídající žluté barvě naznačují místa, u nichž může docházet k difuzní limitaci. Oblasti znázorněné červeně jsou oblasti, ve které dochází s nejvyšší pravděpodobností k difuzní limitaci. Jak je dle *obrázku 165* vidět, červené a žluté „kritické oblasti“ se u AnoxKaldnes nosiče vyskytují vcelku hojně, kdežto pro nanovláknenný nosič je těchto oblastí velice malé nebo

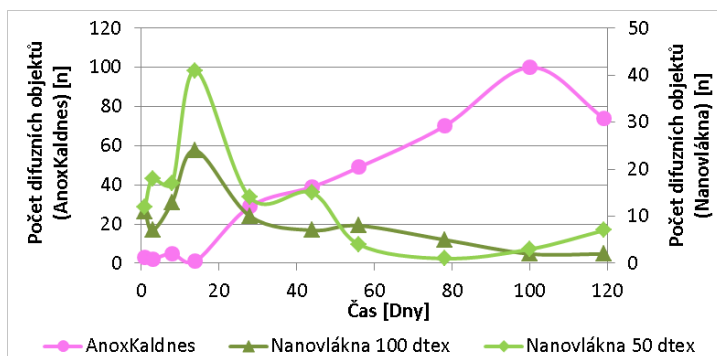
dokonce chybí zcela. Výsledkem je, že pro nanovláknenný nosič se difuzně limitované oblasti vytváří jen minimálně, právě v důsledku existence mnoha kanálků (porozita hodnocena v bodu 3), které hodnoty limitační difuzivity výrazně snižují. Zde uvedené závěry jsou platné pouze pro 2D charakter biofilmu, pro 3D model budou vypočtené hodnoty rozdílné.



Obrázek 165 – Obrazová analýza – Znázornění měření difuzivity vyjádřený jako obraz pro AnoxKaldnes a nanovláknenný nosič (119.den kolonizace)

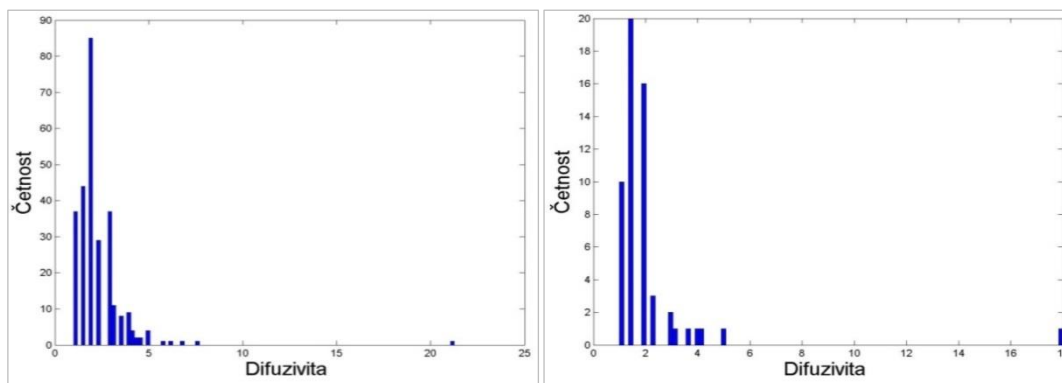
Na základě výše uvedených grafů lze stanovit, jak se mění difuzní vzdálenost (resp. difuzivita) jednotlivých objektů na povrchu celého nosiče (resp. v biofilmu zachyceném v obraze). Významným parametrem je i určení, kolik těchto objektů, u nichž může nastat difuzní limitace, může v obraze existovat. Výsledek je zachycen na grafu níže, *obrázek 166*. Z výsledků lze vidět, že pro nosič AnoxKaldnes počet difuzních objektů v čase roste a jejich počet dosahuje ke konci pokusu hodnoty 100 (tj. v obraze existuje 100 oblastí, u nichž může docházet k difuzní limitaci). Naopak pro nanovláknenný nosič počet difuzně limitujících objektů v čase nejen že klesá, ale jejich počet byl v závěru experimentu roven hodnotě 3. Maximální počet difuzně limitovaných kolonií, pro nanovláknenný nosič, bylo ve 14.den celkem 40.

Počet objektů (oblastí) identifikovaných v obraze, u nichž může nastávat difuzní limitace je u AnoxKaldnes nosiče průměrně 2.5x více než u nanovláknenného nosiče. V závěru experimentu, kdy je množství biomasy největší a hodnocení stavu reaktoru je nejdůležitější, je dokonce až 30x více difuzně limitujících objektů na nosiči AnoxKaldnes než na nanovláknenném nosiči. V důsledku tohoto hodnocení a v porovnání s reálným stavem reaktoru (dle *kapitoly 3.3*) je možné, že v závěru experimentu skutečně nastala pro nosič AnoxKaldnes difuzní limitace (špatný prostup živin, substrátu či kyslíku) do aktivního biofilmu, v důsledku čehož efektivita biologického čištění poklesla (viz *kapitola 3.3, obrázek 103*). Difuzní limitace pro nanovláknenný nosič nenastala, prostup substrátu a živin do aktivovaného biofilmu byl zachován, biodegradace zůstala velice efektivní (viz *kapitola 3.3, obrázek 103 a 104*).



Obrázek 166 – Obrazová analýza – Počet difuzních objektů

Graf rozložení hodnot průměrné difuzní vzdálenosti objektů na povrchu nosičů dokládají následující histogramy (jednotkami na ose-x jsou pixely), které byly vyneseny pro objekty ve 120. den kultivace. Charakter histogramů byl shodný po celou dobu kultivace. V obou případech, pro oba typy nosičů, se jedná o logaritmo-normální rozdělení.



Obrázek 167 – Obrazová analýza – Histogram hodnot průměrné difuzní vzdálenosti objektů

9) Fraktální dimenze

Fraktální dimenze objektu charakterizuje nepravidelnost (míru nerovnosti, drsnosti) obrysu (hranice) daného objektu (kolonie). Hodnoty fraktální dimenze se pro 2D obraz pohybují v rozmezí (1 – 2). Vyšší fraktální dimenze indikuje více nepravidelný povrch (resp. okraj) buněčného seskupení. Dle literatury je předpokladem klesající charakter křivky fraktální dimenze u obou typů nosičů, především v důsledku střížných sil v reaktoru, které mají na charakter růstu biofilmu dominantní vliv.

Na počátku experimentu se na nosiči AnoxKaldnes vytvářejí malé kolonie (dle bodu 5), které jsou neporézní (dle bodu 3). Fraktální dimenze je v daný čas blízká hodnotě 2, což odpovídá kompaktní a izotropní struktuře biofilmu, biofilm téměř dokonale vyplňuje daný prostor. Postupem času se na nosiči AnoxKaldnes vytvářejí větší objekty s větší porozitou a křivka fraktální dimenze klesá. Fraktální dimenze kombinuje výsledky získané z měření velikosti objektů s hodnocením jejich porozity. Výsledky fraktální dimenze pro komerční nosič AnoxKaldnes jsou v obecné shodě s kvalitativním vyjádřením dle (Hermanowicz et al. 1995) a dle (de Beer et al., 1994).

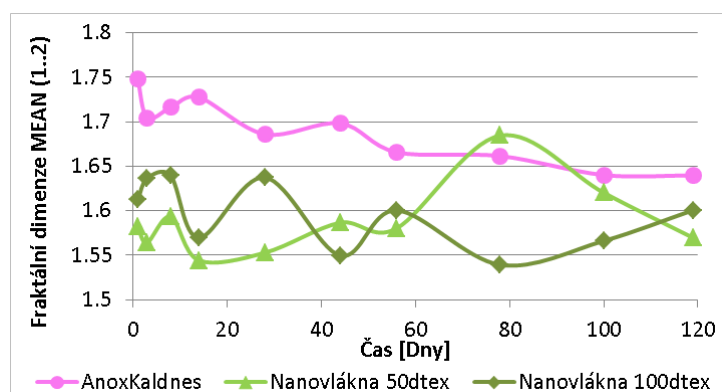
Minimální hodnoty fraktální dimenze (pro oba nosiče) je rovna 1.3. Více než 50 % všech objektů pro nosič AnoxKaldnes dosahuje fraktální dimenze v rozmezí 1.7 – 1.8, pro nanovláknenný nosič v rozmezí 1.5 – 1.6. Průměrné hodnoty fraktální dimenze u nosiče AnoxKaldnes jsou v průběhu

experimentu rovna 1.7, maximální hodnoty fraktální dimenze dosahují hodnoty 1.87. Průměrné hodnoty fraktální dimenze u nanovláknenného nosiče jsou v průběhu experimentu rovna 1.6, maximální hodnoty fraktální dimenze dosahují hodnoty 1.83.

Dle (Hermanowicz et al. 1995) platí, že malé agregáty (struktury menší než 5 μm) biomasy jsou poměrně kompaktní a izotropní, což indikuje fraktální dimenze blízká hodnotě 2 (tj. pro nosič AnoxKaldnes). Větší struktury s lineárními rozměry větší než 20 μm bývají méně kompaktní, s menší fraktální dimenzí, což zde platí pro nanovláknenný nosič.

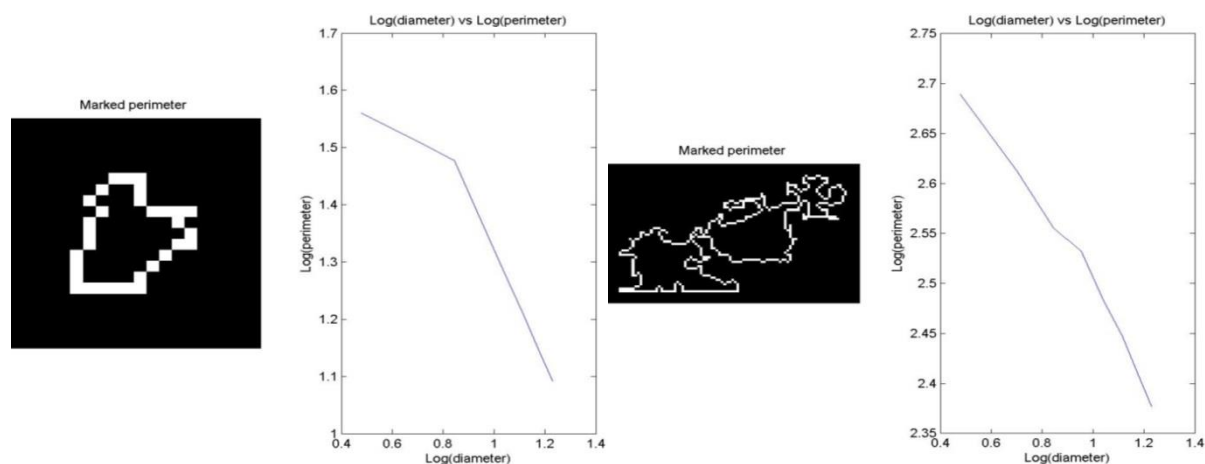
Hodnoty fraktální dimenze objektů identifikovaných na nanovláknenném nosiči jsou v průměru nižší než fraktální dimenze objektů na komerčním nosiči. Kolonie biofilmu na nanovláknenném nosiči jsou porézní, méně kompaktní. Trend křivky fraktální dimenze objektů identifikovaných na nanovláknenném nosiči je po celou dobu experimentu téměř konstantní, a to dokonce i pro malé objekty (do velikosti 20 μm), u nichž by se tento výsledek neočekával. Pro větší objekty je výsledek ve shodě s literaturou dle (Hermanowicz et al. 1995; de Beer et al., 1994), ovšem výsledky fraktální dimenze pro malé objekty identifikované na nanovláknenném nosiči ve shodě s literaturou nejsou.

Lze předpokládat, že výsledky v literatuře uvádějí kolonizaci na pevných inertních nosičích (jako je komerční nosič AnoxKaldnes). Ovšem výsledky pro scaffoldové nosiče (scaffoldy jako uměle vytvořené porézní struktury předem definovaných tvarů, dle Ma and Elisseeff, 2006), jako je nanovláknenný nosič, se s literaturou neshodují. Obecné teorie, které platí do dnešních dnů, tak mohou být pro nové materiály (jako nanovláknena) nepřesné nebo neúplné. Charakteristické vlastnosti nanovláken (vysoký měrný povrch, vysoká pórovitost, malé rozměry pórů a další) umožňují bakteriálnímu biofilmu (resp. bakteriím), který nanovláknenný materiál kolonizuje, vytvářet naprosto ojedinělé struktury, které navíc vykazují jedinečné vlastnosti, které doposavad nebyly u jiných materiálů pozorovány.



Obrázek 168 – Obrazová analýza – Fraktální dimenze

Vykreslením podobného grafu, který byl uveden v teoretické části v kapitole 2.6.1, bod 8, obrázek 27, získáme vlastní graf, který je vidět na obrázku níže. Pro lepší znázornění je u každého grafu uveden objekt, pro něhož daný graf platí. Vykreslené objekty byly identifikovány na nosiči AnoxKaldnes ve 44. den kolonizace. Pod každým obrazem je uvedena výsledná hodnota fraktální dimenze a to popořadě (region A, region B, případně region C).



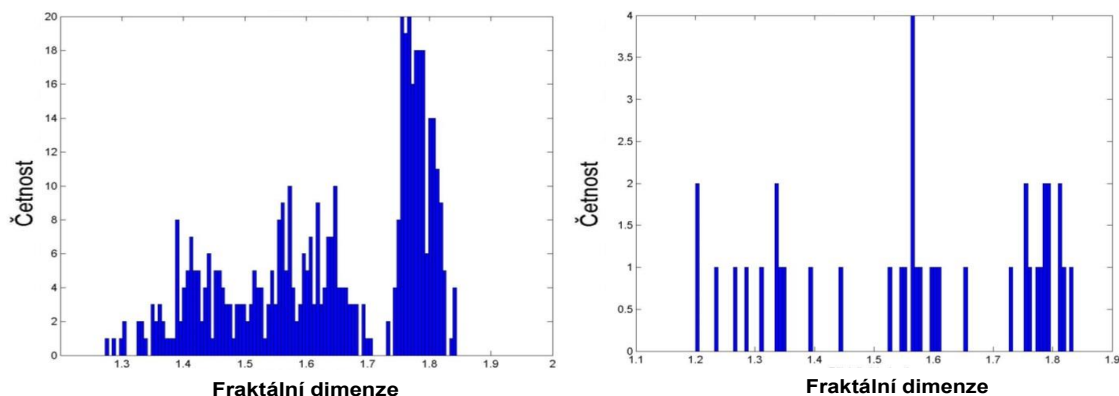
Fraktální dimenze (1.787, 1)

Fraktální dimenze (1.63, 1.7, 1.467)

Obrázek 169 – Obrazová analýza – Ukázka výpočtu fraktální dimenze objektů

Obrázek výše (obrázek 169 vpravo) potvrzuje, že objekty mohou mít více než jen dvě geometrická měřítka, což je v souladu s literaturou dle (Hermanowicz et al. 1995; de Beer et al., 1994). Z dat pod obrázkem 169 je vybrána nejvyšší hodnota a tato reprezentuje fraktální dimenzi daného objektu. Ze všech objektů identifikovaných v obraze je spočten průměr, jehož hodnota je uvedena jako bod v daném čase ve výše uvedeném grafu na obrázku 168.

Graf rozložení hodnot fraktální dimenze objektů na povrchu nosičů dokládají následující histogramy, které byly vyneseny pro objekty ve 120.den kultivace. Charakter histogramů byl shodný po celou dobu kultivace. Na nosiči AnoxKaldnes charakter rozložení histogramu určit nelze, ale z grafu je patrné, že se na nosiči vyskytují dvě různé oblasti (tj. graf lze aproximovat dvěma Logaritmicke-normálními rozděleními). Pro nanovláknenný nosič, lze charakter histogramu aproximovat Rovnoměrným rozdělením.



Obrázek 170 – Obrazová analýza – Histogram hodnot fraktální dimenze objektů

10) Další hodnocené parametry

Dalšími hodnocenými parametry při obrazové analýze biofilmu byly parametry: horizontální a vertikální běhová délka, ekvivalentní průměr kruhu, solidita. Všechny tyto parametry jsou uvedeny v příloze práce (Příloha D).

Kapitola „*Obrazového hodnocení biofilmových struktur – identifikace plošných parametrů*“ shrnuje základní poznatky ohledně identifikovaných oblastí v obraze (identifikovaného biofilmu na nosiči). Všechny výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.

Hlavním výsledkem hodnocení plošných biofilmových struktur je potvrzení vhodnosti nanovláknenného nosiče při kolonizaci bakteriální populací. Nanovláknenný nosič umožňuje bakteriím rychlou kolonizaci, především v počátečních stavech kultivace (kolonizace nanovláknenného nosiče probíhá již během několika hodin kultivace). Nanovláknenné struktury umožňují zde upoutanému biofilmu získat jedinečné vlastnosti; biofilm je vysoce homogenní s převládajícím směrem růstu podél nanovláken; biofilm obsahuje četné kanálky, které umožňují efektivní transport živin a kyslíku do vnitřních struktur biofilmu a jen velice minimálně dochází k difúzní limitaci; kolonie utvářené na nanovláknenných strukturách jsou vysoce homogenní a okraje kolonií velice hladké, výsledkem je strukturně pevný a odolný biofilm.

4.5.2. Texturní parametry

Texturní parametry odrážejí rozložení intenzity stupně šedi a důležitým hodnocením je určení jejich závislost na orientaci snímku. Podle výsledků disertační práce a v souladu s literaturou dle (Lewandowski and Beyenal, 2007) nejsou zde hodnocené texturní parametry (texturní entropie, energie, homogenita) závislé na poloze, otočení snímku nebo barevné transformaci obrazu. Otáčení či změna snímku však mění a ovlivňuje hodnoty všech plošných parametrů, a to v souladu s literaturou dle (Lewandowski and Beyenal, 2007).

1) Texturní entropie

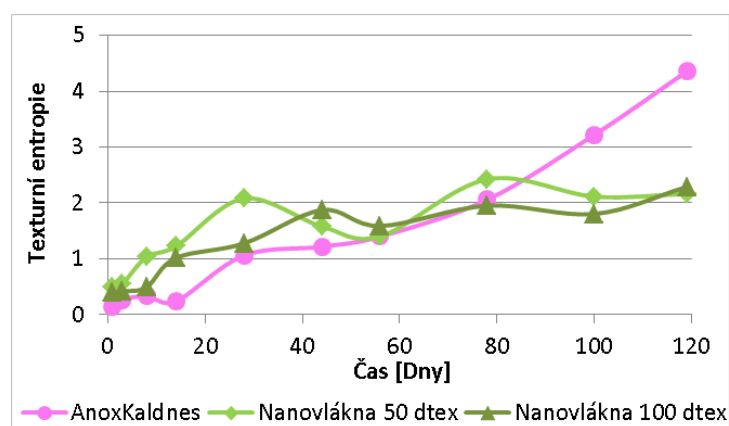
Texturní entropie obrazu odráží reálnou heterogenitu biofilmu v obraze, čím vyšší je texturní entropie, tím více je biofilm na nosiči heterogenní. (Haralick et al., 1973)

Na počátku experimentu existuje na nosiči AnoxKaldnes rovnoměrné, homogenní pokrytí (stejně jako u nanovláknenného nosiče). Případně mohou být nízké hodnoty texturní entropie způsobeny absencí biofilmu v obraze, což může paradoxně vést k vysoké homogenitě snímku. Homogenní pokrytí se však postupem času mění na heterogenní (dle grafu na *obrázku 171*). Na nosiči se časem utvářejí plochy, které jsou pokryté homogenně a plochy, které pokryté biofilmem nejsou vůbec (dle *obrazu 172*), proto jsou hodnoty texturní entropie postupně rostoucí (heterogenita obrazu roste). Tento závěr může vést k myšlence, že na nosiči AnoxKaldnes kolonie na počátku pokusu narušují jeho povrch (bylo prokázáno již v bodě 2 předešlé kapitoly) a dále se tyto kolonie již jen rozšiřují a utvářejí mohutnější celky. Adherující buňky musí být chráněny před uvolněním díky smykovému tření s cílem udržet se dostatečně dlouho na povrchu pro nezvratnou adhezi, aby mohlo dojít k tvorbě mikrokolonií a nakonec i k rozvoji biofilmu, proto je drsnost povrchu dominantním faktorem při primární kolonizaci.

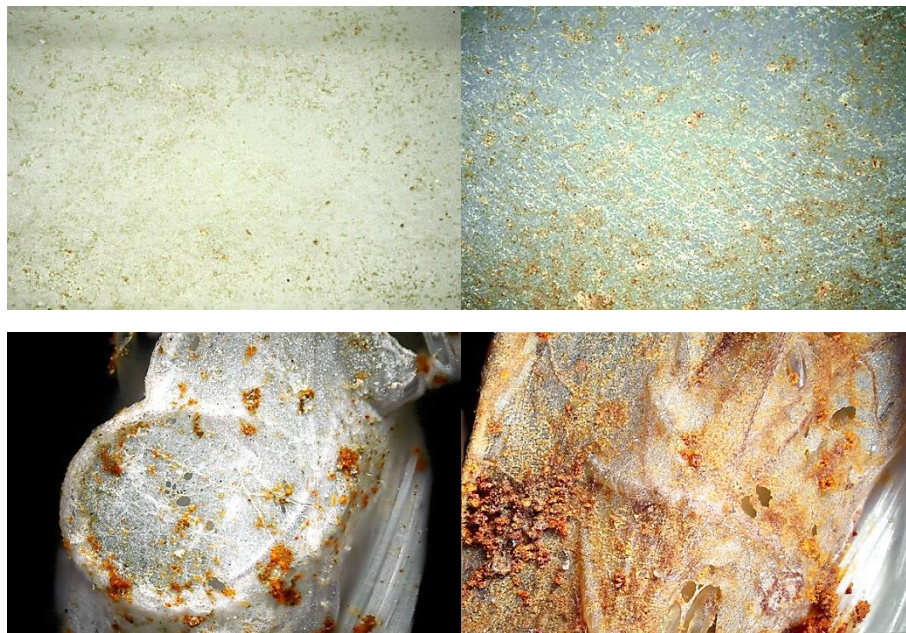
Pro nanovláknenný nosič je texturní entropie nižší a po většinu času kultivace se hodnoty příliš nemění, což nasvědčuje tomu, že nosič je po celou dobu kultivace vcelku homogenně pokrýván

biofilmem. Navíc biofilm vytvářený na nanovlákněm nosiči vytváří mohutnější celky, jelikož parametr texturní entropie má nižší hodnoty (mohutnější biofilm má nižší entropii než tenký biofilm), a to v souladu s literaturou (dle Gjaltema et al. 1994; Brent and Peyton, 1996, Loosdrecht et al. 1995). Nanovlákněné struktury prokázali pozitivní vliv na utváření biofilmu, nejen že biofilm kolonizuje nanovlákněné povrchy rychleji (dle bodu 2 předešlé kapitoly), ale navíc je povrch nanovláken pokrýván velice homogenně a rovnoměrně (fotografická dokumentace je uvedena níže na *obrázku 172*) a mohutnost biofilmu je až dvakrát vyšší než biofilm utvářený na komerčním nosiči AnoxKaldnes.

Dle hodnot texturní entropie lze dále předpokládat, že kolonizace nosiče nebyla ukončena, jelikož hodnoty entropie jsou vyšší než 0. Texturní entropie zcela porostlého nosiče (kompletně zaplněného biofilmem) by měla dosahovat hodnot blízkých hodnotě 0 (počet objektů v tomto čase by byl roven 1). Jelikož zde je texturní entropie pro oba typy nosičů stále postupně rostoucí (resp. neklesající), nasvědčuje to situaci neukončené kolonizace nosiče (na povrchu nosiče stále existují místa, která nejsou pokryta biofilmem), proces vývoje biofilmu nebyl ukončen.



Obrázek 171 – Obrazová analýza – Texturní entropie

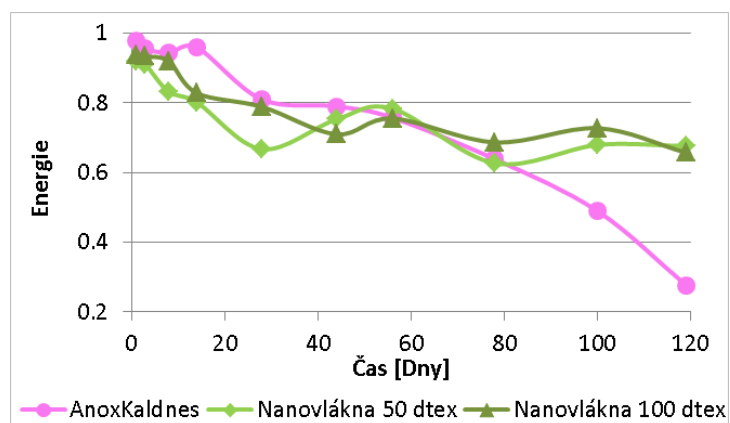


Obrázek 172 – Snímky biofilmu na nosiči AnoxKaldnes a na nosiči nanovlákněm, na počátku a na konci kultivace (snímky nebyly zachyceny na stejném místě nosiče)

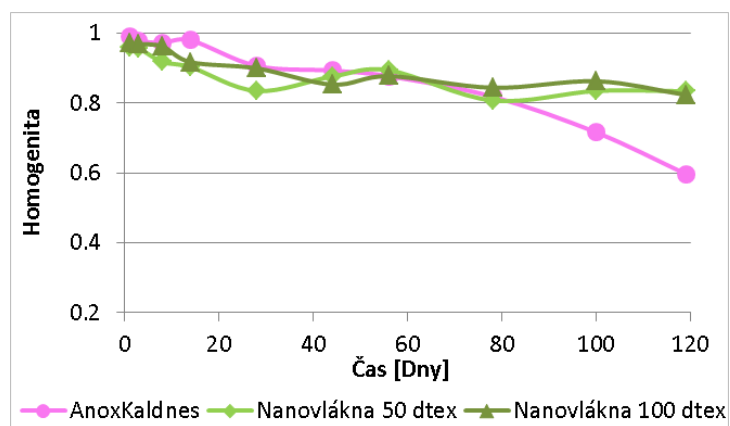
2) Energie a Homogenita

Menší hodnoty energie znamenají časté a opakované vzory klastrů pixelů; vyšší energie znamená více homogenní strukturu obrazu s menším počtem opakovaných vzorů, větší směrovou jednotnost. Pokles energie je způsoben směrovými změnami ve struktuře pixelů klastrů v obrazu. Vyšší homogenita znamená více stejnorodou strukturu obrazu. Pokud parametr homogenity klesá, pak roste počet vzorků. Hodnoty homogenity značí větší, či menší změny v kontrastu snímku. Pokles homogenity je způsoben opakujícím se vzorem pixelových shluků. (Haralick et al., 1973)

Pro nosič AnoxKaldnes platí vyšší směrová jednotnost (více homogenní struktura) s menším počtem opakovaných vzorů pouze v počátku experimentu, časem se směrová jednotnost vytrácí. Směrové změny ve struktuře pixelů klastrů v obrazu způsobují pokles energie, což značí časté a opakované vzory klastrů pixelů. Parametr energie a homogenity jsou nižší u obrazu, kde se struktury více opakují. Takto charakterizované struktury jsou častěji pozorovány u tenkého biofilmu dle (Haralick et al., 1973).



Obrázek 173 – Obrazová analýza – Energie



Obrázek 174 – Obrazová analýza – Homogenita

Pro nanovláknenný nosič se energie během prvních dvou týdnů rychle sníží, dále již zůstává prakticky nezměněna. Výraznější pokles energie je způsoben výraznějšími změnami ve struktuře pixelů klastrů v obrazu. Vyšší energie znamená více homogenní strukturu obrazu s menším počtem opakovaných vzorů. Parametr energie a homogenity jsou vyšší u obrazu, kde se vyskytuje mohutnější biofilm dle (Haralick et al., 1973).

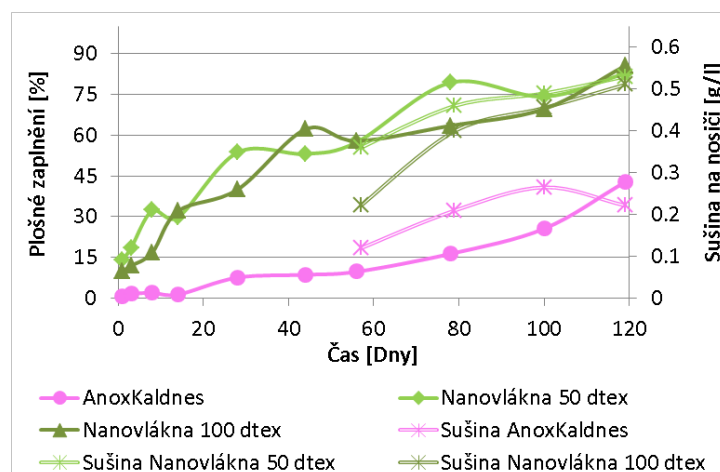
Výsledný biofilm, který se formuje rychleji, bude méně hustý (Tijhuis et al. 1994a, Bishop et al. 1995), avšak dle (Loosdrecht et al. 1995; Brent and Peyton, 1996) se hustota biofilmu zvyšuje s rostoucími střížnými silami na biofilm. Ačkoli dle literatury (Lewandowski and Beyenal, 2007) přesný mechanismus tohoto pozorování stále chybí, bylo na základě výše uvedených výsledků zjištěno, že i biofilm, který se vyvíjí rychle (zde je to biofilm na nanovláknenném nosiči), může za předpokladu vyšších střížných sil na povrchu biofilmu dosahovat i vyšší hustoty (resp. moci aktivního biofilmu).

Kapitola „*Obrazového hodnocení biofilmových struktur – identifikace texturních parametrů*“ shrnuje základní poznatky ohledně charakterizace identifikovaných oblastí v obrazu (biofilmu na nosiči). Všechny výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.

Hlavním výsledkem hodnocení texturních parametrů je vhodnost použití nanovláknenného nosiče. Nanovláknenný nosič je vcelku homogenně pokrýván biofilmem, kdežto pro komerční nosič AnoxKaldnes je pokrývání povrchu více heterogenní, tj. existují místa, která jsou dobře pokrývána, ale zároveň existují místa bez pokryvu. Vyšší energie u biofilmových struktur na nanovláknenném nosiči naznačuje skutečnost, že biofilm má více homogenní strukturu. Parametry energie a homogenity jsou pro nanovláknenný nosič vyšší, což naznačuje přítomnosti mohutnějšího biofilmu (v porovnání s komerčním nosičem AnoxKaldnes).

4.6. Korelace obrazového hodnocení s laboratorními metodami

Výsledná kinetika růstu biofilmu na nosičích vyhodnocená obrazovou analýzou, dle parametru stanovení plošného zaplnění (dle kapitoly 4.5.1, bod 2), byla korelována s výsledky stanovení sušiny (dle metody v kapitole 1.1.3 teoretické části práce, výsledky reálného ověřování nosiče jsou shrnuty v kapitole 3.3).

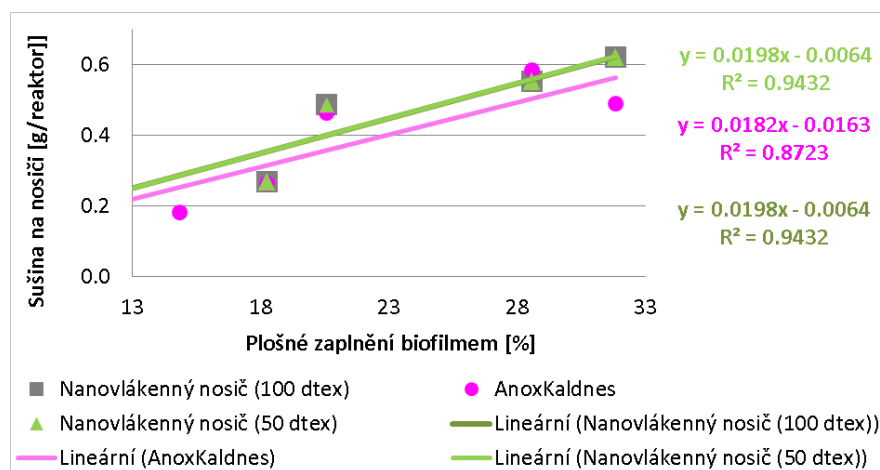


Obrázek 175 – Korelace časového průběhu nárůstu biofilmu (průběh kolonizace) a vyjádření sušiny

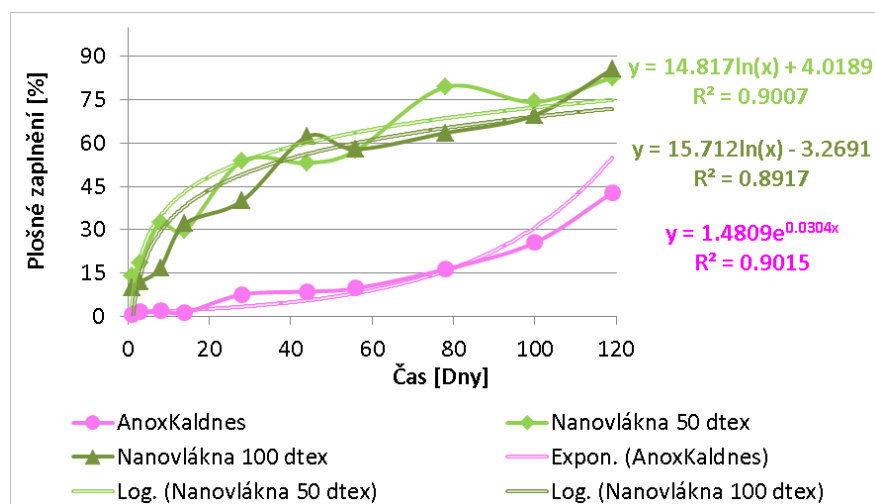
Na obrázku 175 výše je znázorněn průběh nárůstu biofilmu na nanovláknenném a komerčním nosiči AnoxKaldnes získaném obrazovou analýzou. Současné je v grafu uvedena sušina (znázorněna dvojčarou). Trend nárůstu sušiny v období 56. – 119. den „více méně“ koresponduje s nárůstem

zaplňování nosiče biofilmem z obrazového hodnocení. Sušina před 50. dnem experimentu stanovována nebyla z důvodu velice malých nárůstů biofilmu na nosiči, které nebylo možné vážkovým měřením stanovit.

Lepší představu o shodě obou přístupů lze získat z *obrázku 176*, kde jsou oba parametry (získané sušinou a obrazovou analýzou) vyjádřeny společně. Parametr R^2 určuje míru shody (resp. míru přímé závislosti mezi parametry). V našem případě se podařilo sestavit algoritmus obrazového hodnocení výpočtu plošného zaplnění biofilmu na nosiči tak, že se shoda s gravimetrickým měřením pohybuje v rozsahu od 87 % do 94 %.



Obrázek 176 – Korelace mezi parametry sušiny a plošného zaplnění biofilmem



Obrázek 177 – Kinetika růstu mikroorganismů na nosičích

Výsledkem použití metody odhadu biofilmu na nosiči použitím obrazové analýzy může být vyjádření kinetiky růstu mikroorganismů na jednotlivých podkladech (nosičích, *obrázek 177*), a to neinvazivní metodou nenarušující ani nosič, ani samotný biofilm. Výsledkem je charakterizace bakteriálního biofilmu neinvazivní metodou, kde výsledky mají stejnou vypovídací schopnost s výstupy, které se získávají standardními invazivními časově náročnými metodami. Díky obrazové analýze byly navíc získány i další informace, které jinými metodami získat ani odhalit nelze (*kapitola 4.5.1 a kapitola 4.5.2*). Výše zhodnocené výsledky jsou validní pro tenké biofilmy (tj. pro počáteční fáze kolonizace), a to protože hodnocení probíhá v plošném měřítku. V budoucnu bude příhodné se věnovat také

biofilmům mohutnějším, bude nutné vypracovat metodiku hodnocení biofilmu ve 3D rozměru a tyto výsledky porovnat se zde uvedenými výsledky hodnocení plošných parametrů.

Kapitola „*Korelace obrazového hodnocení s laboratorními metodami*“ shrnuje základní poznatky z ověření vyvíjené neinvazivní metodiky hodnocení obrazu biofilmu na nosičích biomasy, metodu analýzy obrazu dává do souvislosti s gravimetrickým stanovením sušiny. Měření sušiny bylo provedeno společným měřením se studentem Tomášem Dubem (sušina byla hodnocena v průběhu experimentu s reálnou odpadní vodou obsahující fenoly, dle kapitoly 3.3). Hodnocení obrazovou analýzou, reprezentace a publikace dat byla provedena autorem disertační práce.

Cílem kapitoly bylo ověření souladu gravimetrického stanovení sušiny s neinvazivním hodnocením založeným na vyvinuté metodice analýzy obrazu. Výsledek potvrzuje cca 90% shodu vyvinuté metodiky analýzy obrazu s gravimetrickým hodnocením.

G ZÁVĚR

V předkládané disertační práci byly předneseny výsledky v oblasti použití nanovláken (scaffoldového materiálu) jako podkladu pro bakteriální biofilm. V rámci disertační práce byl selektován nejvhodnější polymer (na základně testů kolonizace, stability nanovrstev, aj.). Dále byl stanoven ideální poměr těchto nanovláken na podkladové niti (ideální míra povrstvení). Výsledkem práce tak je návrh nitě, která již splňuje všechny kritické požadavky na vývoj a výrobu nanovláčenného nosiče biomasy pro reálné aplikace na ČOV. Z finálně uskupené nitě a na základě patentové rešerše byly navrženy, vytvořeny a otestovány fluidní a fixní nosiče biomasy. U těchto nových nosičů byly hodnoceny stěžejní charakteristiky jako bioaktivita, toxicita, možnosti opětovné rekolonizace, možnosti tvorby mohutnějšího biofilmu, měření hustoty komplexu po nárůstu biomasy a další.

Přednost využití nanovláken pro aplikace na ČOV je především jejich vysoký měrný povrch; bakteriím tato struktura umožňuje vysokou adhesivitu k povrchu, což v důsledku zjednodušuje imobilizaci bakterií, zejména v úvodních fázích kolonizace (rychlejší zapracování nosiče), případně během náročných havarijních stavů (zkrácení potřebné doby regenerace systému). Díky morfologii povrchu (velká pórovitost a malé rozměry pórů) je výsledná struktura biofilmu více stabilní, což navíc zajišťuje stabilní účinnosti biologického čištění. Nanovláčka umožňují daleko vyšší resistenci imobilizovaných bakterií vůči okolním podmínkám a dokonce dochází ke snížení vlivu skokových změn v průběhu činnosti reaktoru, například při extrémních nárazových stavech (výkyvy látkového zatížení, teploty aj.), které nastávají v reálné průmyslové praxi producentů průmyslových odpadních vod velice často.

Mezi zásadní výhody nanovláčenného nosiče patří možnost nastavovat densitu nosiče dle požadavků specifické aplikace (900 kg/m^3 až 1200 kg/m^3); možnost narůstání bakteriálního biofilmu nejen na povrchu vlákna, ale také blíže k jeho středu (ochrana před toxickými vlivy okolního prostředí); efektivnější degradace odpadních vod bez oscilací účinnosti. Pochopitelně stále existuje několik sporných otázek, jako dezintegrace nanovláken, toxicita na vyšší organismy či dokonce bioakumulace vláken v organismech, což je nutné dále studovat.

Cílem disertační práce byl také návrh programového prostředku pro hodnocení vázaných mikroorganismů (biofilmu) pomocí analýzy mikroskopického obrazu. Vytvořen byl komplexní automatický kód v programovém prostředí Matlab, který velice dobře kompenzuje nevýhody manuálního hodnocení. Průměrný čas k vyhodnocení jednoho obrazu automatickým kódem je 36 sekund (manuální hodnocení často dosahuje i několika hodin). Vyhodnocená data jsou vypsána do tabulkového editoru (využívá se MS Excel, ale lze nastavit i jinak), výstupní grafy a obrázky jsou exportovány ve formě „JPG“ obrazů do dané výstupní složky. Díky obrazovému hodnocení lze mimo jiné získat detailnější informace o biofilmu a dále o možnostech jeho vytváření v závislosti na podkladovém materiálu a jeho vlastnostech (morfologie povrchu aj.). Současné 2D hodnocení je zcela postačující především při hodnocení pomalu rostoucích bakteriálních populací, pro tenké biofilmy nebo pro hodnocení počáteční fáze kolonizace. Výsledná korelace mezi obrazovým a gravimetrickým stanovením biomasy (stanovením sušiny) dosahuje v průměru 90 %.

Obrazová analýza dále prokázala, že pro nanovláčenný nosič není nutná tvorba primárního biofilmu (jako je tomu u jiných nosičů dle La Motta 1980), ale právě díky struktuře nanovláčenného pokryvu dochází ihned k procesu tvorby sekundárního biofilmu (permanentní zachycení). Díky čemuž je počáteční i opakované zapracování nosiče několikanásobně rychlejší. Obrazovým hodnocením lze

získat například i kinetiku růstu biofilmu v závislosti na okolních podmínkách (teplota, pH, salinita aj.). Moderní přístup za využití analýzy obrazu umožňuje nedestruktivní hodnocení bakteriálního biofilmu na libovolném podkladovém materiálu, navíc je možné odhalit další skryté souvislosti v charakterizaci struktury biofilmu a v jeho tvorbě, které mohou pomoci při charakterizaci celého systému biologického čištění.

Doporučení na pokračování práce v daném tématu

Jelikož současný stav problematiky stále nedovoluje optimální a bezchybné hodnocení úniku nanovláken z podložní nitě (dezintegrace nanovláken) bude tato sporná otázka předmětem dalších studií a navazujících měření. Stejně tak v současné době neexistuje vhodná metodika pro hodnocení toxicity nanočástic na vyšší organismy (existují velké problémy s agregací a sedimentací částic), proto i zde je velké pole působnosti k dalšímu testování. Velké testování nanovlákených nosičů je plánováno pro komunální ČOV (v předkládané disertační práci byla pozornost věnována pouze vodám průmyslovým, vysoce zatíženým). U komunálních ČOV, bude cílem sledování ulpívání aktivovaného kalu k nanovlákeným strukturám a hodnocení charakteristik takto vzniklého biofilmu (především aktivita biofilmu, hodnocení difúzní limitace pro mohutnější biofilm a potenciální možnosti zarůstání sítě pleteniny, jelikož se bude jednat o rychle rostoucí bakteriální populaci).

Obrazová analýza v rámci předkládané disertační práce přispěla k odhalení důležitých souvislostí a nových aspektů inovativních materiálů. V obrazové analýze budou dále hodnoceny a měřeny parametry jako vliv střížných sil na morfologii povrchu biofilmu, vliv pH, vliv teploty, salinity a další.

Prezentovaná metoda obrazové analýzy stále obnáší mnohá úskalí. Optické hodnocení biofilmu platí jen pro tenké vrstvy biofilmu. Postupem času, přibližně po dvou měsících v závislosti na rychlosti růstu mikroorganismů, není vhodné tuto metodu používat, protože biofilm je již velice mohutný a metoda již není zcela validní, poté jsou příhodné gravimetrické metody. Možností jak postup dále vylepšit je použití mikroskopu s možností měření v ose „z“, a to pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (Lawrence et al., 1991). Jedná se o tzv. hodnocení biofilmu ve 3D rozměru, kde technika umožňuje nedestruktivní způsobem, bezdotykově, dvourozměrné optické řezy biofilmu a jeho trojrozměrnou rekonstrukci (Deeber et al, 1994; Stoodley et al, 1994). Využití konfokální mikroskopie bude náplní práce v dalších experimentech.

Výsledky z obrazové analýzy navíc pomohou k vytvoření vhodnějšího modelu růstu biomasy v bioreaktorech. Obrazová analýza dále přispěje především k vytvoření modelů (na základě Picioreanu et al., 1998; Lardon et al., 2002) pro nové materiály, jako jsou scaffoldové podklady (využití nanovlákených struktur) u nichž standardní modely (dle Hermanowicz et al. 1995; de Beer et al., 1994) selhávají nebo ne zcela odpovídají předpokladům.

Další možné využití potenciálu obrazové analýzy v laboratorních experimentech je plánováno pro experimenty: testování stability a dezintegrace nanovláken barvením polyuretanové vrstvy nebo využitím fluorescenční mikroskopie; určení vlivu mikroorganismů na stav nosiče (hodnocení narušování povrchu nosiče a jeho stability), velký potenciál se také skýtá v hodnocení dispergovaných mikroorganismů, resp. aktivovaného kalu, kde lze hodnotit jeho morfologické a kompoziční vlastnosti (zastoupení EPS, počet a struktura vláken a vloček aj.). Díky včasné detekci vláknitých organismů na ČOV tak bude možné například předcházet nežádoucím stavům pěnění či bytnění kalu.

H SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ STUDENTA

a) Impaktované a recenzované články

DOSTÁLKOVÁ J., JIRKŮ V., KŘIKLAVOVÁ L., PROCHÁZKOVÁ G., SUCHÁNEK M., BRÁNYIK T., *The utility of cell surface characterization in the application of cellulolytic biofilms*. World Journal of Microbiology and Biotechnology (2013), v tisku.

TRÖGL J., JIRKOVÁ I., ZEMÁNKOVÁ P., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P., PAVLORKOVÁ J., KURÁŇ P., POPELKA J., KŘIKLAVOVÁ L.: *Estimation of the quantity of bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst via phospholipid fatty acids content: A preliminary study*. Folia Microbiol. 2 (2013) 135-140. DOI: 10.1007/s12223-012-0189-3. IF = 0.677

KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., DUB, T., KORTUSOVÁ D., LEDERER T.: *Vývoj alternativních nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod*. Vodní hospodářství 2013, 63 (5), 151–155. (recenzovaný časopis).

KŘIKLAVOVÁ, L., VALECKÝ, L., DUB, T., NOVÁK L., LEDERER, T.: *Metody obrazové analýzy aktivovaných kalů a biofilmů*. Sovak 2013, v tisku. (recenzovaný časopis)

KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., JIRKŮ, V., *The use of composite fibers for production of biomass carriers*, Uveřejněno v knize: "Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges" (ISBN: 978-981-4405-03-4), edited by A. Mendez-Vilas and published by World Scientific Publishing Co., (Pub. date: 2012), pp 187-191.

TRÖGL J., KRHŮTKOVÁ O., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P., HOLÍČEK R., KOHLOVÁ M., HEJDA S., SMRČKA J., BOUŠKOVÁ A., KŘIKLAVOVÁ L.: *Removal of nitrates from high-salinity wastewaters from desulphurization process with denitrifying bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst*. Int. J. Environ. Sci. Technol. 3 (2012) 425-432. DOI: 10.1007/s13762-012-0048-4. IF = 3.157

BOUŠKOVÁ A., MRÁKOTA J., STLOUKAL R., TRÖGL J., PILAŘOVÁ V., KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T.: *Three examples of nitrogen removal from industrial wastewater using Lentikats Biotechnology*. Desalination 280 (2011) 191-196 DOI: 10.1016/j.desal.2011.07.001 IF = 1,851

LEDERER T., KŘIKLAVOVÁ L. kapitola *Využití nanovláknenných materiálů jako nosiče biomasy*. In Chemicky podporované in situ sanační technologie, 1. st ed.; Černík M. a kol., Ed.; ISBN: 978-80-7080-767-5; VŠCHT: Praha, 2010; pp str. 255 – str. 266.

b) Ověřené technologie

Technologie čištění odpadních vod s využitím nanovláknenného nosiče biomasy. (2013) (Lederer, Křiklavová, Sanetrník, Pluhař, uplatněno 2012 pro Bochemie a.s. Bohumín IČ 27654087)

RIV/46747885:24220/10:#0001648 – Technologie výroby plošného útvaru z přízí obsahujících nanovláknena (2010) (Jirsák, Sanetrník, Křiklavová, Lederer, uplatněno 2010 pro TREVOS Košťálov, s r.o.)

RIV/46747885:24220/11:#0001811-Použití imobilizovaných mikroorganismů pro nitrifikaci v odpadních vodách s vysokým obsahem amonných iontů a anorganických solí (2011) (Dolina, Lederer, Křiklavová, Ševců, uplatněno 2011 pro LentiKats)

RIV/60461373:22330/08:00020961-Technologie čištění toxických odpadních vod v biofilmovém fluidním bioreaktoru s využitím přirozené imobilizace cíleně připravených mikroorganismů. (2008) (Lederer, Štros, Jirků, Křiklavová, uplatněno 2008 pro AQUATEST a.s, IČ 44794843)

c) Články ve Scopus nebo Web of Knowledge databázi

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., LEDERER T.: *Development of nanofiber support for use as a carrier of bacterial biomass in wastewater treatment*, NANOCON 2012, 23. – 25. 10. 2012, Brno; Sborník bude pravděpodobně zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

KŘIKLAVOVÁ, L., LEDERER, T., *A Review Study Of Nanofiber Technology For Wastewater Treatment*, NANOCON 2011, 21. – 23. 09. 2011, Brno; ISBN 978-80-87294-23-9; Sborník byl zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., *The use of nanofiber carriers in biofilm reactor for the treatment of industrial wastewaters*, NANOCON 2010, 12. – 14. 10. 2010, Olomouc; ISBN 978-80-87294-18-5; Sborník byl zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

d) Vystoupení na konferencích a další publikace

Mezinárodní konference

KŘIKLAVOVÁ, L., KRACÍKOVÁ, B., *Degradation of phenol by Rhodococcus Erythropolis in presence of magnetic fields*, 5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation, Prague, June 24 – 28, 2012, p. 131-134. ISBN 978-80-7080-825-2.

TRÖGL J, KRHŮTKOVÁ O., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P. HOLÍČEK R., KOHLOVÁ M., HEJDA S., SMRČKA J., BOUŠKOVÁ A., KŘIKLAVOVÁ L.: *Removal of Nitrates from High-Salinity Wastewaters from Desulphurization Process with Denitrifying Bacteria Encapsulated in Lentikats Biocatalyst*. Mezinárodní konference IWA: Water and Industry 2011, Valladolid, Španělsko, 1. – 4. května 2011. Přednáška. Plný text ve sborníku konference.

KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., *The use of composite fibers for production of biomass carriers*, BioMicroWorld2011 – IV International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, 14. – 16. 09. 2011, Málaga, Spain; ISBN 978-80-87294-18-5.

LEDERER T., NOVÁK L., KŘIKLAVOVÁ L., JIRKŮ V., *Operating Experiences with the First Czech Application of MBBR Technology for Treatment of Industrial Wastewaters in CHBČOV Draslovka Kolín*, 7th Anque's International Congress – "Integral Water Cycle: Present And Future", 13-16 June 2010, Oviedo (Spain), ISBN 978-84-693-2257-4

LEDERER T., KŘIKLAVOVÁ L., *Application of Nanofibres for Biological Treatment of Industrial Wastewaters*, The Eighteenth Annual International Conference on COMPOSITES/NANO ENGINEERING (ICCE – 18), July 4-10, 2010, Anchorage, Alaska, USA,

KRIKLAVOVA LUCIE (TUL), DE WEVER HELEEN (VITO), *Sustainable water use in chemical, paper, textile and food industries*, Study carried out for VITO 2010 (výzkumná, závěrečná zpráva z doktorandské stáže)

LEDERER T., NOVÁK L., KŘIKLAVOVÁ L., *Operating experience with the first application of technology in MBBR CR in the treatment of industrial wastewater in CHBČOV Draslovka Kolín*, Odpadní vody, 8. Mezinárodní konference a výstava, květen 2009, Plzeň, ISBN 978-80-254-4068-1.

Tuzemské konference

KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., DUB, T., KORTUSOVÁ D., LEDERER T.: *Vývoj alternativních nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod*. Odpadové vody 2012, 17. – 19. 10.2012, Štrbské Pleso, Slovensko; ISBN 978-80-970896-2-7, pp 36-42.

KŘIKLAVOVÁ, L., VALECKÝ, L., DUB, T., NOVÁK L., LEDERER, T.: *Metody obrazové analýzy aktivovaných kalů a biofilmů*. Odpadové vody 2012, 17. – 19. 10.2012, Štrbské Pleso, Slovensko; ISBN 978-80-970896-2-7, pp 140-147.

DVOŘÁK, L., LEDERER, L., KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L.: *Dlouhodobé zkušenosti s první plno-provozní aplikací MBBR technologie v ČR*. Odpadové vody 2012, 17. – 19. 10.2012, Štrbské Pleso, Slovensko; ISBN 978-80-970896-2-7.

KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., *Nanovláknenné materiály jako nosiče biomasy*, Řešení extrémních požadavků na čištění odpadních vod, Blansko, 24. – 25. 02. 2011. Tribun EU, p. 52-60. ISBN 978-80-7399-286-6.

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., *Hodnocení míry kolonizace na nosiči biomasy využitím obrazové analýzy*, Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi IV, Třeboň, 17. – 19. 10. 2011. Ekomonitor, spol. s r.o., p. 156-159. ISBN 978-80-86832-61-6.

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., LEDERER, T., *Využití nanovláknenných nosičů při biologickém čištění podzemních vod znečištěných fenoly*, Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi IV, Třeboň, 17. – 19. 10. 2011. Ekomonitor, spol. s r.o., p. 42-48. ISBN 978-80-86832-61-6.

LEDERER, T., KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., *Provozní zkušenosti s první aplikací MBBR technologie v ČR při čištění průmyslových a podzemních odpadních vod na CHBČOV Draslovka Kolín*, Sanační technologie XII, květen 2009, Uherské Hradiště, ISBN 978-80-86832-44-9

KŘIKLAVOVÁ, L.; LEDERER, T. In (ed.), *Optimalizace biologického čištění průmyslových odpadních vod v biofilmovém bioreaktoru*, Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi, Žďár nad Sázavou, 8. – 9. 10. 2008. Ekomonitor, spol. s r.o., p. 42-49. ISBN 978-80-86832-37-1.

I SEZNAM POUŽÍVANÉ LITERATURY

ANOXKALDNES™ MBBR. Technologie AnoxKaldnes™ MBBR - nosiče [online] [cited 2012-03-20]. Dostupné z: <<http://www.veoliawaterst.com/mbbr/cz/carriers.htm>>.

AOI, Y. (2002) In situ identification of microorganisms in biofilm communities. J. Biosci. Bioeng. 94, 552–556.

AKINSON, B. (1981) Immobilized biomass-a basis for process development in wastewater treatment. In Biological Fluidized Bed Treatment of Water and Wastewater (Cooper, P.E. and Akinson, B., eds), pp. 22–34, Ellis Horwood.

BABU, B.V. (2007) Biofilms in the removal of VOCs and Foul Odours. Proceedings of National Seminar on Bio Films: Challenges & Applications, Bharatiya Vidya Bhavan's Bhavan' Research Center in Collaboration with University of Mumbai - Sesquicentennial Celebrations, January 12-13.

BEYENAL H., DONOVAN C., LEWANDOWSKI Z., HARKIN G. (2004) Three-dimensional biofilm structure quantification, Journal of Microbiological Methods 59, 395– 413.

BISHOP P. L., ZHANG T. C., FU Y.C. (1995) Effects of biofilm structure, microbial distribution and mass transport on biodegradation processes. Wat. Sci. Tech., 31 (1), 143-152.

BRENT M. PEYTON (1996) Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density, Water Research, Volume 30, Issue 1, January 1996, Pages 29-36, ISSN 0043-1354, 10.1016/0043-1354(95)00110-7.

BRYERS J.D., CHARACKLIS W. G. (1982) Biotechn. Bioeng. 24, 2451.

BURKOVSKI A (EDITOR) (2008). *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-30-1.

CAO. Y. S. AND ALAERTS, G. J. (1995). Influence of reactor type and shear stress on aerobic biofilm morphology, population and kinetics. Water Res. 29, 107-118.

CLOETE (2010), *Nanotechnology in Water Treatment Applications*, Horizon Scientific Press, ISBN 1904455662, 9781904455660.

ČECH J. S., CHUDOBA J. (1988) Effect of the solids retention time on the rate of biodegradation of organic compounds. Acta Hydrochim. Hydrobiol., 16(3), 313-323.

ČEJKOVÁ A., MASÁK J., FIALOVÁ A., SIGLOVÁ M., JIRKŮ V. (2005) Biodegradation potential of *Rhodococcus erythropolis* towards aromatic compounds. Water Sci. & Technol. 52,151, ISSN 0273-1223.

ČEJKOVÁ A., MASÁK J., JIRKŮ V., VESELÝ M., PÁTEK M., NEŠVERA J. (2005) Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. World J. Microbiol. Biotechnol. 21, 317-321, ISSN 0959-3993.

DECHO, A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. Cont. Shelf Res. 20, 1257–1273.

DONLAN R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8: 881-890.

DONG, Z., ET AL. (2011) Treatment of oilfield wastewater in moving bed biofilm reactors using a novel suspended ceramic biocarrier. Journal of Hazardous Materials, vol. 196, p. 123–130. ISSN 0304-3894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.001.

DUCHÁČEK V., HRDLÍČKA Z. (2009) *Gumárenské suroviny a jejich zpracování*, Vydavatelství VŠCHT Praha, 200 s., ISBN 978-80-7080-713-2.

EIGHMY, T. T, MARATEA, D. AND BISHOP, P. L. (1983). Electron microscopic examination of wastewater biofilm formation and structural components. Appl. Eny. Microb. 45, 1921-1931.

GJALTEMA A., ARTS P.A.M., VAN LOOSDRECHT M.C.M., KUENEN J.G., HEIJNEN J. J. (1994) Heterogeneity of biofilms in rotating annular reactor: Occurrence, Structure and Consequences, Biotechnol. Bioeng., 44, 194-204.

GRIJSPEERDT, K. (1997) Image analysis to estimate the settleability and concentration of activated sludge. Water Research., vol. 31, no. 5, p. 1126-1134. ISSN 00431354. DOI: 10.1016/S0043-1354(96)00350-8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135496003508>.

- HARALICK, J. H., K. SHANMUGA, AND I. DINSTEIN (1973). Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 3 (6):610-621.
- HERMANOWICZ S.W. (1998) A model of two-dimensional biofilm morphology. *Water Sci. Tech.* 37: 219-222.
- HERMANOWICZ S.W., SCHINDLER U., WILDERER P. (1995) Fractal structure of biofilms: New tools for investigation of morphology, *Water Science and Technology*, Volume 32, Issue 8, Pages 99-105, ISSN 0273-1223, 10.1016/0273-1223(96)00013-3.
- HLAVÁČ, ŠONKA (1992) Počítačové vidění, Grada, ISBN 80-85424-67-3, Praha.
- HLAVÍNEK P. (2010) Biofilmové reaktory. http://water.fce.vutbr.cz/zamestnanci/hlavinek/download/cisteni_OV/prednasky/COV_08.pdf (accessed Jan 10), VUT Brno, Fakulta Stavební, Ústav vodního hospodářství.
- HRDINOVÁ Jitka (2006) Mikrobní biofilm jako nástroj v bioremediačních technologiích, Diplomová práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, květen 2006.
- HEIJNEN J. J., VAN LOOSDRECHT M. C. M., MULDER A., TIJHUIS L. (1992) Formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Wat. Sci. Techn.*, 26 (3/4), 647-654.
- HOEHN R. C., RAY A. D. (1973) *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 45, 2302.
- HORN, H. AND MORGENROTH, E. (2006) Transport of oxygen, sodium chloride, and sodiumnitrate in biofilms. *Chem. Eng. Sci.* 61, 1347–1356.
- CHALFIE, M. ET AL. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.
- CHANG C. I., CHEN K., WANG J. AND ALTHOUSE M. L. G. (1994) A relative entropy-based approach to image thresholding. *Pattern recognition* 27, 1275 -1289.
- Chemický a fyzikální rozbor vody. Available 2. 9. 2010 from [www: http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/rozbor%20vody.doc](http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/rozbor%20vody.doc).
- CHITADE A. (2010) Colour based image segmentation using K-Means Clustering. *International Journal of Engineering Science and Technology*, vol. 2, no. 10, p. 5319–5325.
- CHRISTENSEN, F. R., KIISTENSEN, G. H. AND JANSEN, J. L. C. (1989). Biofilm structure — an important and neglected parameter in wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* 21(8/9), 805-814.
- CHUDOBA J., DOHÁNYOS M., WANNER J. (1991) Biologické čištění odpadních vod. Praha, 1991, ISBN 80-03-00611-2.
- ITO, T. ET AL. (2002) Phylogenetic identification and substrate uptake patterns of sulfate reducing bacteria inhabiting an oxicanoxic sewer biofilm determined by combining microautoradiography and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 356–364.
- JEFFERSON, K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 163–173.
- JIRKŮ V., ČEJKOVÁ A., MASÁK J., PÁTEK M., NEŠVERA J. (2006) Towards the applicability of rhodococci in monoaromatic compounds bioremediation. In: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology*, A. Mendes-Vilas, Ed., Wiley – VCH Verlag, Weinheim p. 561 ISBN 978-3-527-31611-3.
- JIRKŮ V., MASÁK J., ČEJKOVÁ A. (2006) Carrier technology / humic additives to upgrade biological water treatment. In: *Water Pollution, Modelling, Monitoring and Management*, C.A. Brebia and J.S. Antunes do Carmo, Eds. WIT Press, Southampton, Boston, p. 509 ISBN 1-84564-042-X.
- JIRSÁK O., LUKÁŠ D., SANETRník F., MARTINOVÁ L., CHALOUPEK J., RŮŽIČKOVÁ J., KOŠŤÁKOVÁ E., HRŮZA J. (2003) Production and properties of nanofibres. *NANO 03*, Brno University of Technology 2003. Page 142-148. ISBN 80-214-2527-X.
- JIRSÁK O., BHARANITHARAN R., RŮŽIČKOVÁ J., KOŠŤÁKOVÁ E., HRŮZA J. (2004) Nanofibers and Its Application. In *HPTEX 2004*, Coimbatore, India.
- JIRSÁK O., SANETRník F., LUKÁŠ D., KOTEK V., MARTINOVÁ L., CHALOUPEK J. (2005) A method of nanofibers production from polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method, CZ Patent, 294274 (B6) WO 2005024101, March 17.

- JIRSÁK O., SANETRNIK F., KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., (2010) *Technologie výroby plošného útvaru z přízí obsahujících nanovlákná*, uplatněno 2010 pro TREVOS Košťálov, s r.o., RIV/46747885:24220/10:#0001648
- KAPRÁLEK F. (1986) Fyziologie bakterií, SPN Praha.
- KJELLEBERG, S. AND MOLIN, S. (2002) Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 254–258.
- KOMBEREC, L. (2011) Rešerše na stav techniky a patentovou čistotu, Stav techniky textilních nosičů biomasy pro čištění odpadních vod, se zaměřením na pleteninové textilie plošného (případně i chomáčového) útvaru opatřeného nanovlákným pokryvem. Rešeršní zdroje: DB espacenet, stav k 20. 5. 2011; DB Patentscope, stav k 20. 5. 2011; DP freepatentsonline, stav k 23. 5. 2011; DB UPV, stav k 24. 5. 2011.
- LA MOTTA E.J., HICKEY R.F. (1980) Factors affecting attachment and development of biological films on solid media, *Rotating Biological Contactor Technology*, Champion, February 1980.
- LARDON, L., STEYER, J.-P., BERNET, N. AND LE PAGE, C. (2002) Modeling and analysis of biofilms formation and evolution in wastewater treatment processes using multi-agent systems. In: *Integrated assessment and decision support. iEMSs. 1st biennial meeting of the International Environmental Modelling and Software Society*, Lugano, Switzerland, June 24-27, Pp: 226-231.
- LARKIN M. J., KULAKOV L. A., ALLEN CH. C. R. (2005) Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility, *Curr. Opin. Biotech.* 16, 282–290.
- LAWRENCE, J. R., KORBER, D. R., HOYLE, B. D., COSTERTON, J. W. AND CALDWELL, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173, 6558-6567.
- LE NOIR, M. (2011) The Concept of MBBR Process for Water and Sewage Treatment. [online]. 2011 [cited 2012-05-02]. Dostupné z: <<http://dc364.4shared.com/doc/F4TLMedb/preview.html>>.
- LEDERER T. (2011), *Průběžná zpráva k projektu BioCar: Modifikované nosiče biomasy pro čištění odpadních vod*. AQUATEST A.S., Praha.
- NOVÁK L., KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T. (2012), *Průběžná zpráva k projektu BioCar: Modifikované nosiče biomasy pro čištění odpadních vod*. PRO-AQUA CZ, s.r.o., Technická univerzita v Liberci, AQUATEST a.s., Praha.
- LEWANDOWSKI, BEYENAL (2007) *Fundamentals of biofilm research*, CRC Press, ISBN 9780849335419.
- LOOSDRECHT M. C. M., NORDE W., LYKLEMA J., ZEHNDER A. J. B. (1988) Bacterial adhesion: A physicochemical Approach. *Microb. Ecol.* 17, 1-15.
- LOOSDRECHT M. C. M., EIKELBOOM D., GJALTEMA A., MULDER A., TIJHUIS L., HEIJNEN J. J. (1995) Biofilm structures, *Water Science and Technology*, 32 (8), 35–43.
- MA P.X., ELISSEEFF J. (2006) *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, ISBN 1-57444-521-9.
- MANDELBROT, B. (1977) *FractalQ, Form and Chance*. Freeman, San Francisco.
- MANDELBROT, B. (1982) *The Fractal Geometry of Nature*. Freeman, San Francisco.
- MARTÍNKOVÁ L., UHNÁKOVÁ B., PÁTEK M., NEŠVERA J., KŘEN V. (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*, *Environment International*.
- MARTINOVÁ L., MÜLLEROVÁ J. (2005) Electrospinning of polymer blends, In: *5th World Conf. AUTEX*, 27-29 June 2005, Portorož, Slovenia.
- MASÁK J., ČEJKOVÁ A., SIGLOVÁ M., KOTRBA D., JIRKŮ V., HRON P. (2002) Biofilm formation: A tool increasing biodegradation activity. *Proc. Environmental Biotechnology 2002*, Vol. III. Massey University Press, pp. 523-528.
- MASSOLDEYA, A. A., WHALLON, J., HICKEY, R. F. AND TIEDJE, J. M. (1995) Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microb.* 61, 769-777.
- MATLAB. THE MATHWORKS. (2013) [online]. [cit. 2013-06-05]. Dostupné z: <http://www.mathworks.com/help>

- MCLEOD MP, WARREN RL, HSIAO WW, ARAKI N, MYHRE M, FERNANDES C, MIYAZAWA D, WONG W, LILLQUIST AL, WANG D, DOSANJH M, HARA H, PETRESCU A, MORIN RD, YANG G, STOTT JM, SCHEIN JE, SHIN H, SMAILUS D, SIDDIQUI AS, MARRA MA, JONES SJ, HOLT R, BRINKMAN FS, MIYAUCHI K, FUKUDA M, DAVIES JE, MOHN WW, ELTIS LD (2006). "The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse". PNAS 103 (42): 15582–15587. doi:10.1073/pnas.0607048103.
- MCQUARRIE, J. P., ET AL. (2011) Moving Bed Biofilm Reactor Technology: Process Applications, Design, and Performance. Water Environment Research, vol. 83, p. 560–575. ISSN: 1061-4303.
- MILITKÝ J. (2007) Přednášky: Textilní vlákna; Speciální vlákna. II.th ed. TUL, 423 p. ISBN 978-80-7372-169-5.
- MILITKÝ J. (2007) Technické textilie - vybrané kapitoly. II.ed ed. TUL, 238 p. ISBN 978-80-7372-170-1.
- MULDER A., HEIJNEN J. J. (1988) The effect of carrier characteristics on the biofilm development in airlift suspension reactors. Proc. 2nd NBC. Breteler, H., et al. (eds). Amsterdam. 102-110. Biotechnology, 18 (7), 312-320, 2000.
- MULCAHY L. T. AND SHIEH W. K. (1987) Fluidization and reactor biomass characteristics of the denitrification fluidized bed biofilm reactor. Wat. Res. 21, 451458.
- ODEGAARD H., RUSTEN B., SILJUDALEN J. (1999) The development of the moving bed biofilm process – from idea to commercial product, European Water Management, 2(3), 36-43.
- ODEGAARD H. (2006) Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm proces, Water Sci. Technol., 53(9), 17-33.
- O'GORMAN, SAMMON, SEUL (2008) Practical algorithms for image analysis: description, examples, programs, and projects, Cambridge University Press, ISBN 9780521884112.
- O'NEIL F.J., BROMLEY-CHALLENGER K.C.A., GREENWOOD R.J. AND KNAPP J.S. (2000) Bacterial growth on aniline: Implication for the biotreatment of industrial wastewater. Water Research 34, 18, pp 4397-4409.
- ONUMA, M., OMURA T. (1982) Water Sci. Tech. 14, 553.
- NICOLELLA C., LOOSDRECHT M.C.M., HEIJNEN S.J. (2000) Particle-based biofilm reactor technology, Trends in Biotechnology, vol. 18, no. 7, p. 312-320.
- PALMER J., S. FLINT, J. BROOKS (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34, 577-588.
- PELLEG D., MOORE A. (2000) X-means: Extending K-Means with Efficient Estimation of the Number of Clusters, Proceedings of the Seventeenth International Conference on Machine Learning, 29. 6. – 2. 7. 2000. p.727-734.
- PELLETIER C., BOULEY C., CAYUELA C., BOUTTIER S., BOURLIOUX P., BELLON-FONTAINE M.-N. (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1725-1731.
- PETROU M., SEVILL P.G. (2006) Image processing: dealing with texture, John Wiley & Sons Inc., ISBN-13: 978-0-470-02628-1, ISBN-10: 0-470-02628-6.
- PICIOREANU C., VAN LOOSDRECHT M. C. M., HEIJNEN J. J. (1998) Mathematical Modeling of Biofilm Structure with a Hybrid Differential-Discrete Cellular Automaton Approach, Biotechnol Bioeng. Apr 5; 58(1):101-116.
- PIRKL S. (2003) Moderní mikroskopické metody, Univerzita Pardubice.
- POSPÍŠILOVÁ, J., ROUŠAROVÁ, L. Barvové prostory. [online]. 2010 [cited 2012-11-15]. Available from: <<http://geo3.fsv.cvut.cz/vyuka/kapr/sp/2010/soul/index.html>>.
- POSPÍŠILOVÁ D. ET AL. (2010) Biodegradace fenolu biofilmem bakterie *Rhodococcus erythropolis*. In Sanace ekologických zátěží a nebezpečné odpady, Odpadové fórum.
- RŮŽIČKOVÁ J. (2004) Elektrostatické zvlákňování nanovláken. Ist ed. TUL, 54 p. ISBN 80-7083-867-1.
- SIEGRIST, H., GUJER, W. (1985) Mass transfer mechanism in a heterotrophic biofilm. Water Res. 19(11), 1359-1378.
- SINGH R., DEBARATI P., RAKESH K.J. (2006) Biofilms: implications in bioremediation, Trends in microbiology, 14 (9), 389 – 397.

- SPORMANN A.M. (2008) Physiology of microbes in biofilms. In: Romeo T. (ed.), *Bacterial Biofilms*, 17-36. Springer-Verlag, Berlin.
- STANLEY, N.R. AND LAZZAZZERA, B.A. (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52, 917–924.
- STOODLEY, P., DEBEER, D. AND LEWANDOWSKI, Z. (1994) Liquid flow in biofilm systems. *App. Eny. Micro biol.*, 60, 2711-2716.
- ŠPIČKA, I., FISCHER, R. Počítačová geometrie a grafika. [online]. 2002 [cited 2012-11-14]. Available from: <<http://www.person.vsb.cz/archivcd/FMMI/PGG/Pocitacova%20geometrie%20a%20grafika.pdf>>.
- TANI, K. ET AL. (1995) Development of a direct in situ PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4074–4082.
- TIJHUIS L., VAN LOOSDRECHT M.C.M., HEIJNEN J.J. (1994) Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol Bioeng.*, 44,595-608.
- TRÖGL J., JIRKOVÁ I., ZEMÁNKOVÁ P., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P., PAVLORKOVÁ J., KURÁŇ P., POPELKA J., KŘIKLAVOVÁ L. (2013) Estimation of the quantity of bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst via phospholipid fatty acids content: A preliminary study. *Folia Microbiol.* 2, 135-140. DOI: 10.1007/s12223-012-0189-3
- TRÖGL J., KRHŮTKOVÁ O., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P., HOLÍČEK R., KOHLOVÁ M., HEJDA S., SMRČKA J., BOUŠKOVÁ A., KŘIKLAVOVÁ L. (2012) Removal of nitrates from high-salinity wastewaters from desulphurization process with denitrifying bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 3, 425-432. DOI: 10.1007/s13762-012-0048-4
- TRULEAR M., G., CHARACKLIS W. G. (1982) *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 54, 1288.
- VAN DER GEIZE R., AND L. DIJKHUIZEN (2004) Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Microbiology* 7 (3): 255–261. doi:10.1016/j.mib.2004.04.001.
- VAN LOOSDRECHT M. C. M., HEIJNEN J. J., EBERL H., KREFT J., PICIOREANU C. (2002) Mathematical modelling of biofilm structures, *Antonie van Leeuwenhoek*, 81 (1-4):245-256, Publisher: Springer Netherlands.
- WILLIAMSON K., McCarty P.L. (1976) *J. Water Pollut. Fed.* 48, 9.
- WOESE, C. AND FOX, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.
- WROLSTAD R.E., ACREE T.E., DECKER E.A., PENNER M.H., REID D.S., SCHWARTZ S.J., SHOEMAKER C.F., SMITH D., SPORNS P. (2005) Measurement of Protein Content (*Handbook of Food Analytical Chemistry*, Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Smith D., Sporns P., Eds.), John Wiley & Sohns, Inc., New Jersey, str. 73-121.
- WU, MERCHANT, CASTLEMAN (2008) *Microscope image processing*, Academic Press, ISBN 9780123725783.
- YANG X., BEYENAL H., HARKIN G. AND LEWANDOWSKI Z. (2000) Quantifying biofilm structure using image analysis. *J. Microbiol. Meth.* 39, 109 -119.
- YANG X., BEYENAL H., HARKIN G., LEWANDOWSKI Z. (2001) Evaluation of biofilm image thresholding methods, *Wat. Res.* Vol. 35, No. 5, pp. 1149-1158.
- ZÁBRANSKÁ J.; A KOL. (2001) *Laboratorní metody v technologii vody*, VŠCHT Praha, 1. vydání – dotisk 2001, ISBN 80-7080-272-3.
- ZAHID. W. AND GANCZARCYK, J. (1994) A technique for a characterization of RBC biofihn surface. *Water Res.* 28, 2229-2231.
- ZELENY J. (1914) The electrical discharge from liquid points and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces, *Physical Review*, 3(2), 69-91.
- ZHANG, T. C. AND BISHOP. P. L. (1994) Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water Res.* 28(11), 2267-2277.
- ZHANG T. C., FU Y. C., BISHOP P. L. (1994) Competition in biofilms, *Water Science and Technology*, 29 (10-11), 263–270.

PŘÍLOHY DISERTAČNÍ PRÁCE

PŘÍLOHA A – HODNOCENÍ TOXICITY

a) Výsledky měření toxicity – Aerovaný vzorek

Vyhodnocení zkoušky akutní imobilizace dafnií

EC₅₀ (24h) = nelze stanovit

EC₅₀ (48h) = nelze stanovit

V limitní zkoušce nebyla pozorována statisticky významná imobilizace dafnií. Hodnoty EC 50 nelze vyhodnotit.

Imobilizace dafnií

předběžná zkouška

datum: 9.10. – 11.10.2012

ředění	ml·l ⁻¹	1000	500	100	50	10	5	K
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10
imobilizace %	24 h	0	0	0	0	0	0	0
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10
imobilizace %	48 h	0	0	0	0	0	0	0

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota prostředí

předběžná zkouška

datum: 9.10. – 11.10.2012

ředění	ml·l ⁻¹	1000	500	100	50	10	5	K	t°C
O ₂ (mg·l ⁻¹)	0 h	8.1	8.0	8.1	8.1	8.1	8.0	8.1	20.4
O ₂ (mg·l ⁻¹)	48 h	8.5	8.5	8.6	8.5	8.6	8.7	8.6	20.8

pH roztoků

předběžná zkouška

datum: 9.10. – 11.10.2012

ředění	ml·l ⁻¹	1000	500	100	50	10	5	K
pH	0 h	8.0	8.0	7.9	7.8	7.8	7.8	8.0
pH	48 h	8.3	8.1	7.9	7.8	7.8	7.8	7.8

Imobilizace dafnií

limitní zkouška č.1

datum: 16.10. – 18.10.2012

ředění	ml·l ⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	24 h	20	20	20	20	20	20	20	20
imobilizace %	24 h	0	0	0	0	0	0	0	0
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	48 h	20	20	20	20	20	20	20	20
imobilizace %	48 h	0	0	0	0	0	0	0	0

limitní zkouška č.2

datum: 16.10. – 18.10.2012

ředění	ml·l⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K
počet živých dafnií	24 h	10	10	9	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	24 h	20	20	19	20	20	20	20	20
imobilizace %	24 h	0	0	5	0	0	0	0	0
počet živých dafnií	48 h	10	10	9	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	48 h	20	20	19	20	20	20	20	20
imobilizace %	48 h	0	0	5	0	0	0	0	0

limitní zkouška č.3

datum: 16.10. – 18.10.2012

ředění	ml·l⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	24 h	20	20	20	20	20	20	20	20
imobilizace %	24 h	0	0	0	0	0	0	0	0
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	9	10	9	10
počet živ.dafnií celkem	48 h	20	20	20	20	19	20	19	20
imobilizace %	48 h	0	0	0	0	5	0	5	0

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota prostředí

limitní zkouška

datum: 16.10. – 18.10.2012

ředění	ml·l⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K	t°C
O ₂ (mg·l ⁻¹)	0 h	8.3	8.5	8.4	8.3	8.2	8.1	8.0	7.9	19.6
O ₂ (mg·l ⁻¹)	48 h	8.6	8.7	8.7	8.6	8.6	8.5	8.5	8.4	20.4

pH roztoků

limitní zkouška

datum: 16.10. – 18.10.2012

ředění	ml·l⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K
pH	0 h	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.7
pH	48 h	8.3	8.2	8.2	8.1	8.1	8.1	8.0	7.7

b) Výsledky měření toxicity – Odvážení nanovláken

Vyhodnocení zkoušky akutní imobilizace dafnií

EC₅₀ (24h) = nelze stanovitEC₅₀ (48h) = nelze stanovit

V limitní zkoušce nebyla pozorována statisticky významná imobilizace dafnií. Hodnoty EC 50 nelze vyhodnotit.

Imobilizace dafnií

předběžná zkouška

datum: 9.10. – 11.10.2012

ředění	ml·l⁻¹	1000	500	100	50	10	5	K
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10
imobilizace %	24 h	0	0	0	0	0	0	0

počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10
imobilizace %	48 h	0	0	0	0	0	0	0

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota prostředí*předběžná zkouška**datum: 9.10. – 11.10.2012*

ředění	ml·l ⁻¹	1000	500	100	50	10	5	K	t°C
O ₂ (mg·l ⁻¹)	0 h	8.1	8.0	8.0	8.1	8.1	8.1	8.1	20.4
O ₂ (mg·l ⁻¹)	48 h	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.5	20.8

pH roztoků*předběžná zkouška**datum: 9.10. – 11.10.2012*

ředění	ml·l ⁻¹	1000	500	100	50	10	5	K
pH	0 h	8.0	8.0	7.8	7.8	7.8	7.8	8.0
pH	48 h	8.2	8.0	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9

Imobilizace dafnií*limitní zkouška č.1**datum: 17.10. – 19.10.2012*

ředění	ml·l ⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	24 h	20	20	20	20	20	20	20	20
imobilizace %	24 h	0	0	0	0	0	0	0	0
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	48 h	20	20	20	20	20	20	20	20
imobilizace %	48 h	0	0	0	0	0	0	0	0

*limitní zkouška č.2**datum: 17.10. – 19.10.2012*

ředění	ml·l ⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	24 h	20	20	20	20	20	20	20	20
imobilizace %	24 h	0	0	0	0	0	0	0	0
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	10	9
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	9	10	10
počet živ.dafnií celkem	48 h	20	20	20	20	20	19	20	19
imobilizace %	48 h	0	0	0	0	0	5	0	5

*limitní zkouška č.3**datum: 17.10. – 19.10.2012*

ředění	ml·l ⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	9	10	10	10	10
počet živých dafnií	24 h	10	10	10	10	10	10	10	10
počet živ.dafnií celkem	24 h	20	20	20	19	20	20	20	20
imobilizace %	24 h	0	0	0	5	0	0	0	0
počet živých dafnií	48 h	10	10	10	9	10	10	10	10

počet živých dafnií	48 h	10	10	10	10	10	10	9	10
počet živ.dafnií celkem	48 h	20	20	20	19	20	20	19	20
imobilizace %	48 h	0	0	0	5	0	0	5	0

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a teplota prostředí

limitní zkouška

datum: 17.10. – 19.10.2012

ředění	ml·l ⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K	t°C
O ₂ (mg·l ⁻¹)	0 h	8.8	8.8	8.8	8.8	8.8	8.7	8.8	8.2	20.3
O ₂ (mg·l ⁻¹)	48 h	7.7	7.6	7.6	7.7	7.7	7.5	7.5	7.4	20.3

pH roztoků

limitní zkouška

datum: 17.10. – 19.10.2012

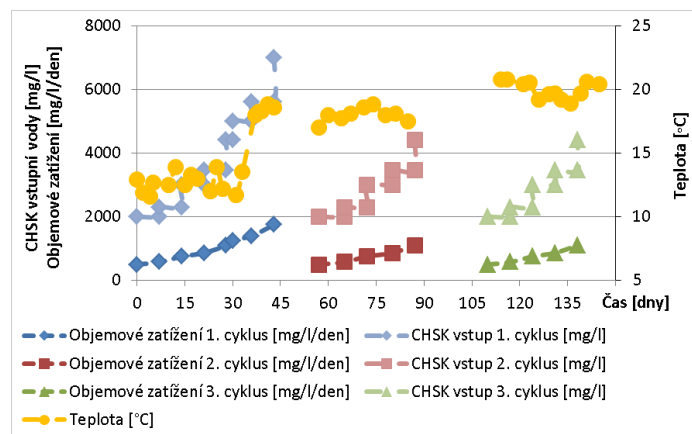
ředění	ml·l ⁻¹	1000	830	690	580	480	400	330	K
pH	0 h	7.8	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.6
pH	48 h	8.1	8.0	7.9	7.8	7.7	7.7	7.7	7.6

PŘÍLOHA B – DOPROVODNÁ MĚŘENÍ REKOLONIZACE

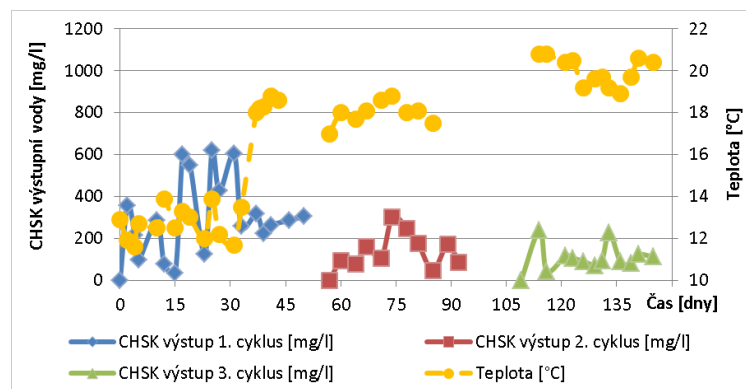
a) Výsledky měření rekolonizace – CHSK

Všechny cykly re-kolonizace nanovláknenných nosičů byly provozovány za stejných vstupních podmínek: doba zdržení, objemové zatížení a CHSK vstupní vody. Avšak během prvního cyklu kolonizace se projevily výrazné vlivy okolního prostředí (nízká teplota), které negativně ovlivnily první dvě třetiny průběhu prvního cyklu. Nejspíše vlivem působení nízké teploty v reaktoru došlo k částečné inhibici mikroorganismů, docházelo k pomalejší degradaci fenolu a k pomalé kolonizaci nosičů. Na počátku byl experiment provozován při teplotě 15 °C, poté byl přesunut do prostředí o teplotě 20 °C. Při této vyšší teplotě dochází k rychlejším nárůstům a re-kolonizaci je možné hodnotit rychleji. Vyšší teplota byla nastavena, aby bylo možné etapu ukončit v reálném čase. Nízká teplota byla způsobena podmínkami v laboratoři.

První cyklus je charakteristický vyššími hodnotami CHSK výstupní vody oproti následujícím dvěma cyklům. V této fázi experimentu je patrné výrazné snižování a stabilizace výstupní CHSK, a to i za zvyšovaného objemového zatížení, právě díky navýšení hodnot teploty. Pro druhý a třetí cyklus byly zachovány stejné vstupní podmínky, výstupní CHSK však dosahovala výrazně nižších hodnot, než v prvním cyklu kolonizace. Potvrdilo se, že předem kolonizovaný nosič může docilovat lepších výsledků, pokud je použit znovu, a to nejen jedná-li se o polymerní komerčně využívané nosiče, ale pro nanovláknenný nosič platí tentýž závěr.



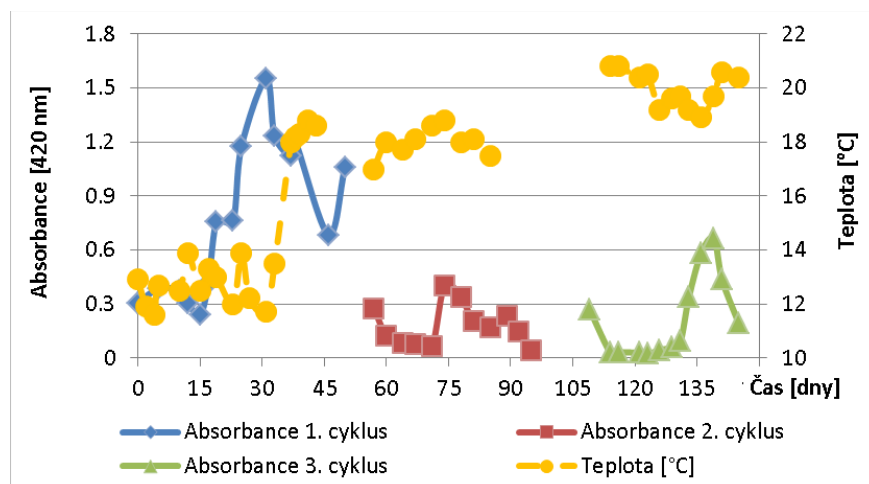
Obrázek 178 - Vstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (vstupní CHSK, objemové zatížení, teplota)



Obrázek 179 - Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (výstupní CHSK, teplota)

b) Výsledky měření rekolonizace – Optická densita

Pro zajištění stejného množství mikroorganismů v reaktoru byla před započítím cyklu kolonizace nastavena absorbance na hodnotu okolo 0.300 (měřeno v 1 cm kyvetě, při vlnové délce 420 nm). Obrázek níže zobrazuje data při měření absorbance. V prvním cyklu dochází k růstu zejména dispergovaných organismů. Po zvýšení teploty v reaktoru dochází k výraznému poklesu absorbance, mikroorganismy začaly ve velkém množství kolonizovat nosiče.

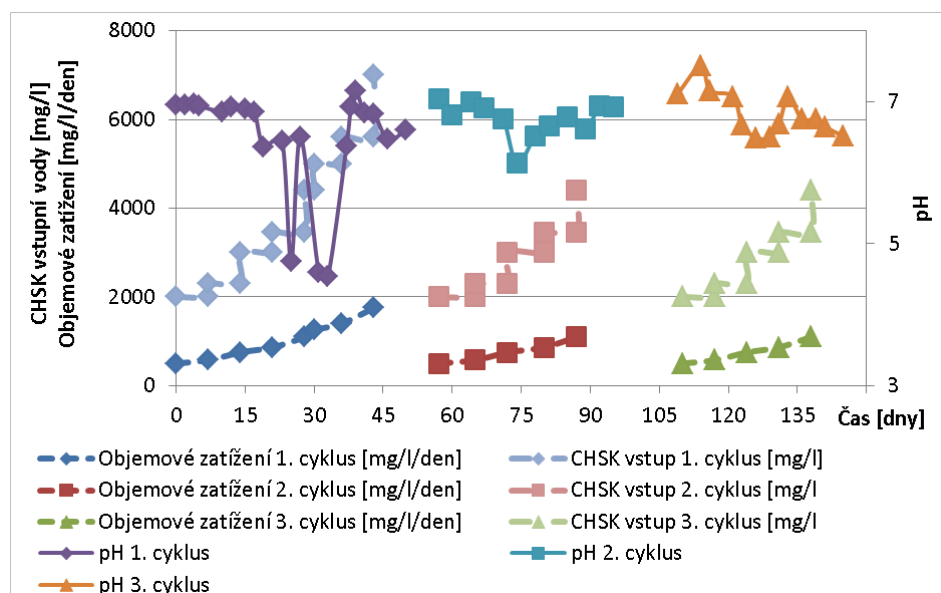


Obrázek 180 - Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (absorbance, teplota)

Ve druhém a třetím cyklu je zřetelný pokles absorbance ihned po začátku testu, nanovláknina jsou kolonizována ihned, všechny mikroorganismy v reaktoru se velice rychle přichytily na nosiče a počty dispergovaných mikroorganismů se rychle snižovali.

c) Výsledky měření rekolonizace – pH

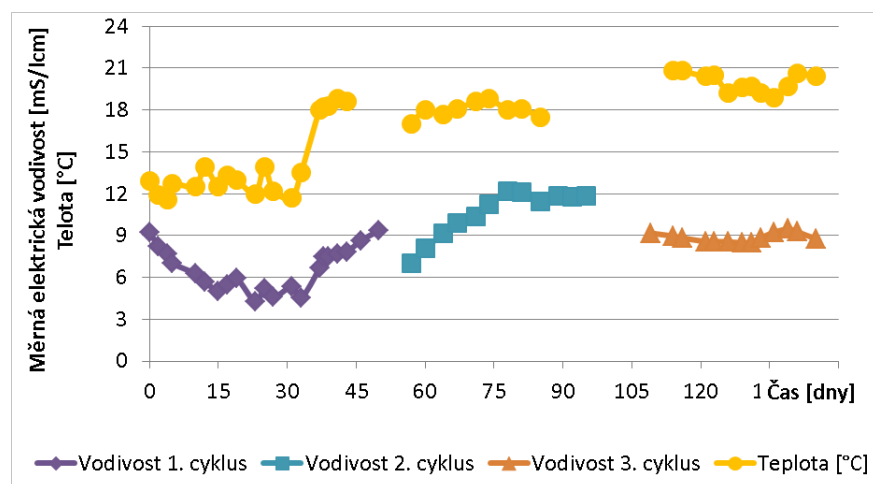
V prvním cyklu je velmi znatelný pokles pH, který nastal v době zvýšení teploty v reaktoru.



Obrázek 181 - Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (vstupní CHSK, objemové zatížení, pH)

d) Výsledky měření rekolonizace – Salinita

Salinita (resp. měrná elektrická vodivost) vstupní vody byla po celou dobu provozu reaktoru udržována na hodnotě 7 mS/cm. V prvním cyklu dochází za nižší teploty k poklesu salinity (pravděpodobně v důsledku nízkého odparu při nízké teplotě). Po zvýšení teploty v reaktoru dochází k nárůstu salinity (pravděpodobně v důsledku vyššího odparu vody a tím k zasolování reaktoru).



Obrázek 182 - Výstupní (měřené) parametry reaktorů pro testy rekolonizace (měrná elektrická vodivost, resp. salinita a teplota)

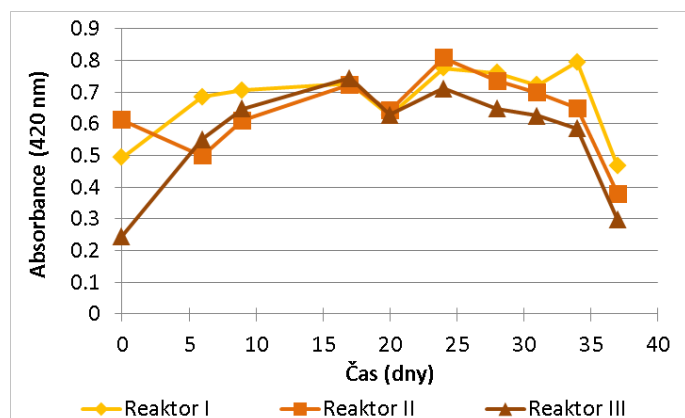
PŘÍLOHA C – DOPROVODNÁ MĚŘENÍ POROVNÁNÍ NOSIČŮ

a1) Výsledky měření fixních nosičů – CHSK

CHSK byla měřena jen pro kontrolu úplné degradace fenolu v bioreaktoru. Zbytkové koncentrace fenolu se pohybovali mezi hodnotami 50 až 100 mg/l. Výsledný graf nemá žádnou vypovídací hodnotu, a proto zde není uveden.

b1) Výsledky měření fixních nosičů – Optická densita

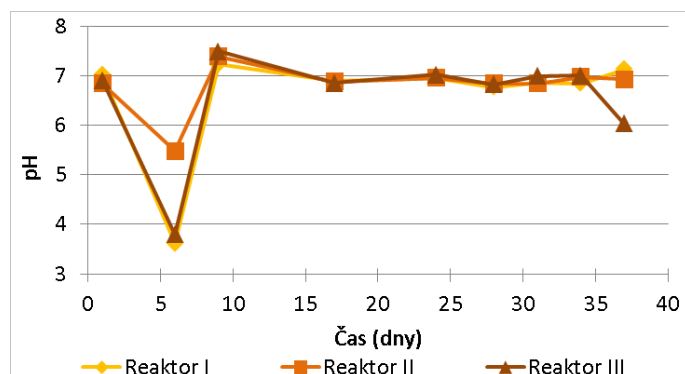
Níže je uveden graf absorbance média v bioreaktorech.



Obrázek 183 - Výstupní parametry při ověřování fixních nosičů - absorbance

c1) Výsledky měření fixních nosičů – pH

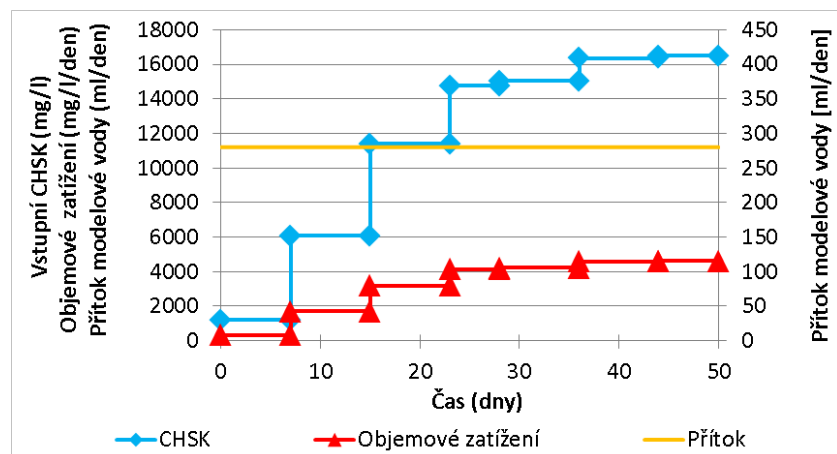
Hodnoty pH byly udržovány v rozmezí 7 – 7.2, na grafu níže jsou zobrazeny hodnoty pH před dávkováním NaOH. Pokles pH na počátku experimentu je pravděpodobně způsoben jen chybou měření (špatnou kalibrací přístroje).



Obrázek 184 - Výstupní parametry při ověřování fixních nosičů - pH

a2) Výsledky měření fluidních nosičů – vstupní zatížení reaktorů

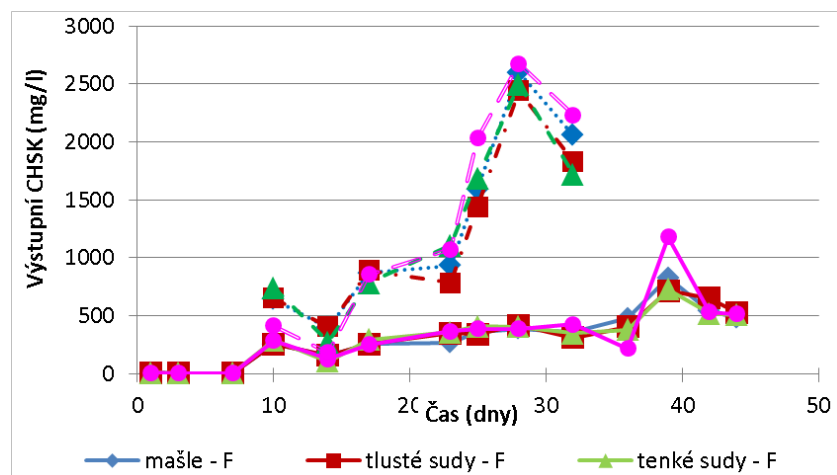
Parametry zatížení bioreaktorů modelovou vodou jsou zobrazeny v grafu níže.



Obrázek 185 – Vstupní parametry při ověřování fluidních nosičů - vstupní CHSK, objemové zatížení, přítok modelové vody

b2) Výsledky měření fluidních nosičů – výstupní CHSK

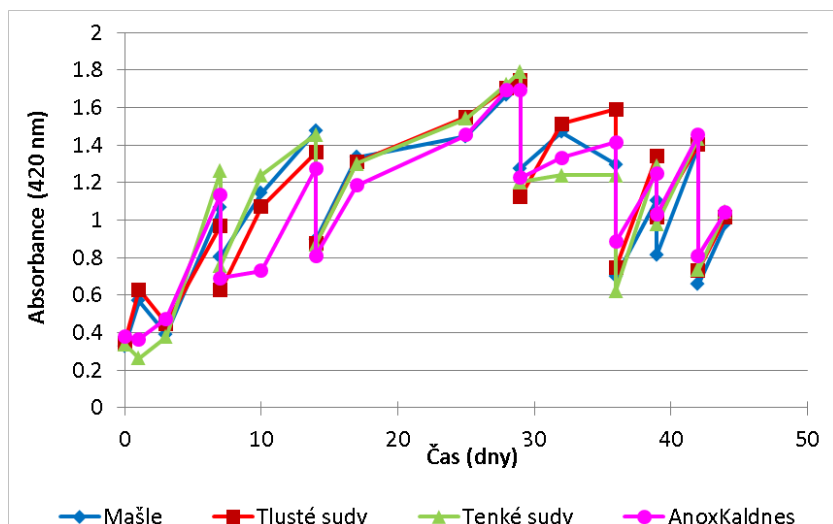
Níže je uveden souhrnný graf výstupní CHSK reaktorů, kde filtrovaná CHSK je označena písmenem F, nefiltrovaná písmenem N.



Obrázek 186 - Výstupní parametry při ověřování fluidních nosičů - výstupní CHSK

c2) Výsledky měření fluidních nosičů – Optická densita

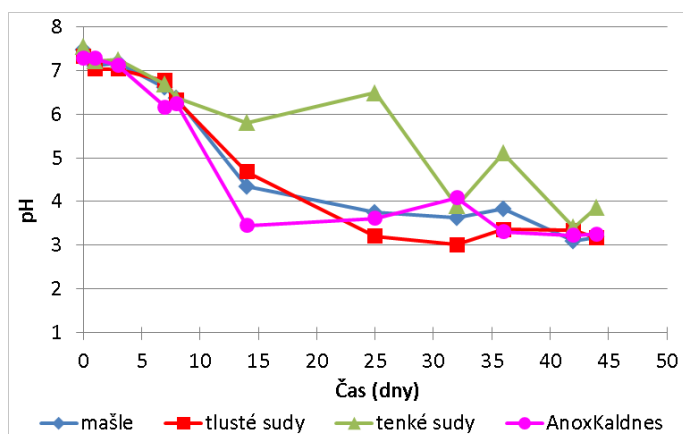
Níže je uveden graf absorpance média v bioreaktorech. Ostré poklesy absorpance byly způsobeny vyředováním reaktorů odstátou vodou, abychom zachovali shodné parametry v průběhu celého experimentu (množství volně rozptýlených mikroorganismů se neúměrně zvyšovalo, což mohlo komplikovat vyhodnocení experimentu).



Obrázek 187 - Výstupní parametry při ověřování fluidních nosičů - absorbance

d2) Výsledky měření fluidních nosičů – pH

V grafu níže jsou znázorněny hodnoty měřeného pH v bioreaktorech. V reaktorech bylo pH po každém měření dorovnáno na hodnotu z rozmezí 7 – 7.2. Toto dorovnávání však v grafu pro lepší přehlednost zachyceno není, zobrazeny jsou jen hodnoty před dorovnáním pH.



Obrázek 188 - Výstupní parametry při ověřování fluidních nosičů - pH

PŘÍLOHA D – DALŠÍ CHARAKTERISTIKY PŘI ANALÝZE BIOFILMU

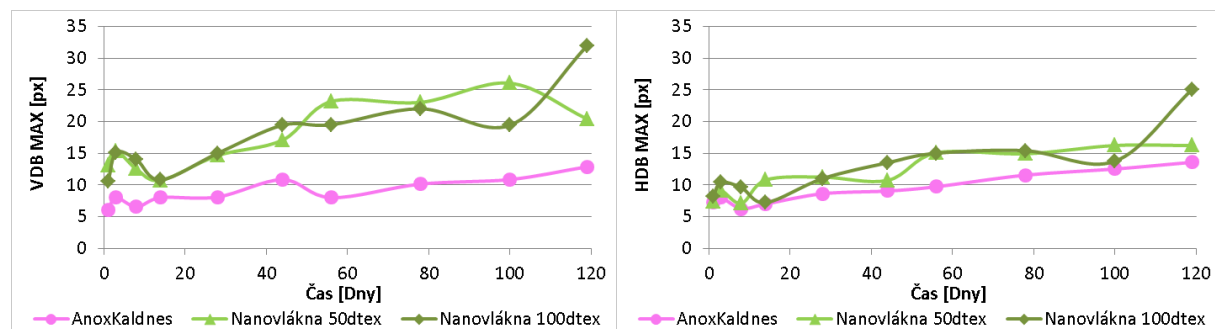
Charakteristiky 1 – 9 jsou uvedeny v kapitole 4.5.1.

10) Horizontální a vertikální běhová délka

Běhová délka reprezentuje rozměry objektu v horizontálním či vertikálním směru, užívá se nejčastěji při určování „preferenčního“ růstu bakteriální populace, například vlivem proudění okolní kapaliny. Hodnoty v níže uvedených grafech reprezentují průměr běhových délek (horizontální či vertikální) všech objektů lokalizovaných na snímcích.

Pro nosič AnoxKaldnes jsou hodnoty obou běhových délek (vertikální VDB i horizontální HDB) a trendy těchto křivek téměř shodné. Lze říci, že pro nosič AnoxKaldnes nedochází k žádnému preferenčnímu růstu biofilmu, biofilm na povrchu nosičů vytváří s nejvyšší pravděpodobností kruhovitě útvary. Tento závěr je logický, neboť kolonie se vytváří na vnitřní straně žebroví nosiče a jejich růst není nikterak ovlivněn prouděním kapaliny, nebo jen velice málo, případně ze všech směru jednotně. Tento závěr koresponduje s výsledky měření kruhovitosti a excentricity a také s výsledky dle literatury (Loosdrecht et al. 1995).

U nanovláknenných nosičů lze pozorovat, že vertikální běhová délka dosahuje mírně vyšších hodnot než horizontální délka běhu. Tento stav poukazuje na mírně preferenční růst biofilmu ve svislém směru, podél nanovláknenných vrstev (podél nosné nitě). Preferenční růst ve svislém směru (podél nitě) s časem roste. Tento závěr podporuje myšlenku, že pro mohutnější biofilm (cca po cca 60.dni kultivace) je preference růstu podél vláken stěžejní, jelikož na mohutnější biofilm působí vnější síly (především střížné síly) intenzivněji a biofilm se musí upoutávat především na místa, kde získá stabilnější a příznivější podmínky ke svému růstu.



Obrázek 189 – Obrazová analýza – Vertikální délka běhu (maximum)

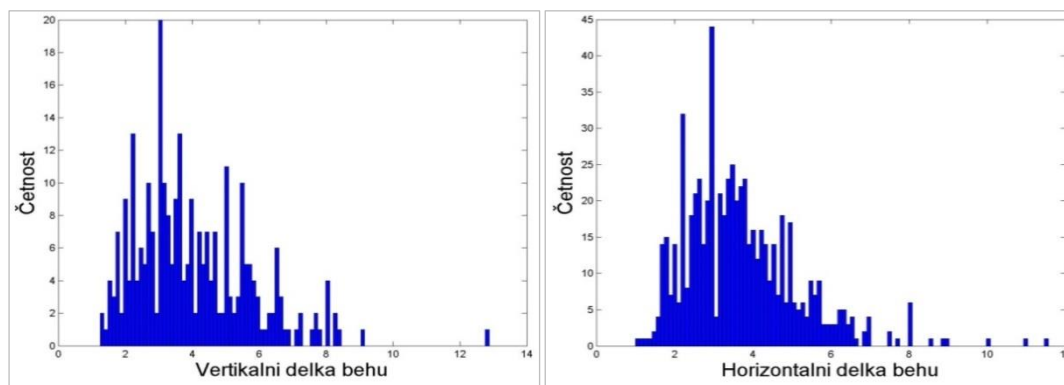
Obrázek 190 – Obrazová analýza – Horizontální délka běhu (maximum)

Pro nosič AnoxKaldnes dosahují průměrné běhové délky VDB a HDB hodnot v rozmezí 3 – 4 pixelů (8.8 – 11.7 μm); minimální VDB a HDB je 1 pixel, směrodatná odchylka je rovna 1.5 pixelu (4.4 μm). Pro nanovláknenný nosič jsou průměrné hodnoty VDB v rozmezí 3.5 až 5 pixelů (10.3 – 14.7 μm), hodnoty HDB v rozmezí 2.5 až 4 pixely (7.3 – 11.7 μm), minimální VDB a HDB je 1 pixel (2.933 μm), směrodatná odchylka je rovna 3 pixely.

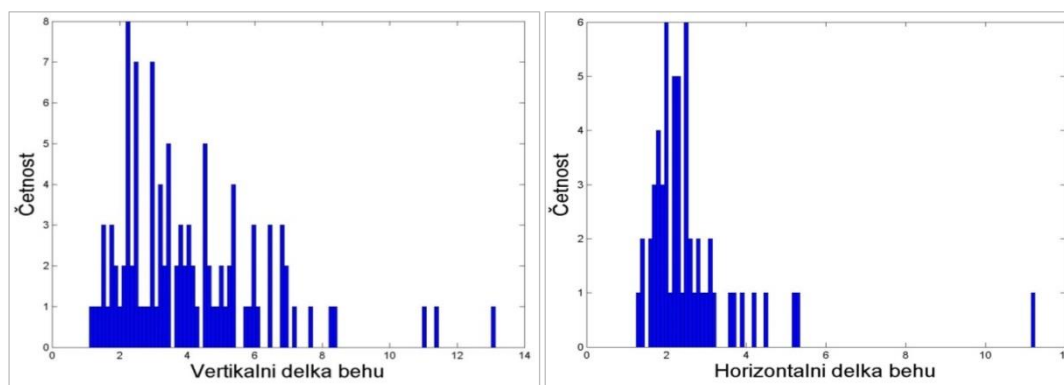
Výrazné rozdíly mezi maximálním a průměrným stanovením dokládá převládající vliv malých kolonií na hodnocení, malé kolonie mají dominantní vliv při analýze obrazu. Více než 50 % hodnot se nachází v rozmezí VDB, HDB do 4 pixelů (pro nanovláknenný i komerční nosič). Dominantní vliv malých kolonií má bohužel na hodnocení neblahý vliv, čehož následkem je velké zkreslení u všech plošných

parametrů (vyjma hodnocení počtu objektů a plošné porozity). Z tohoto důvodu je úprava smazání objektů menších než 0.1 % z celkové plochy obrazu dle kapitoly 4.5 (dle Grijspeerdt, 1997) oprávněná.

Graf rozložení velikosti VDB a HDB na povrchu nosičů dokládají následující histogramy (jednotkami na ose-x jsou pixely), které byly vyneseny pro objekty ve 120.den kultivace. Charakter histogramů byly shodné po celou dobu kultivace. V obou případech, pro oba typy nosičů, se jedná o Normální, resp. logaritmicko-normální rozdělení.



Obrázek 191 – Obrazová analýza – Histogram hodnot VDB a HDB běhové délky objektů nosiče AnoxKaldnes



Obrázek 192 – Obrazová analýza – Histogram hodnot VDB a HDB běhové délky objektů nanovláčenného nosiče

11) Ekvivalentní průměr kruhu

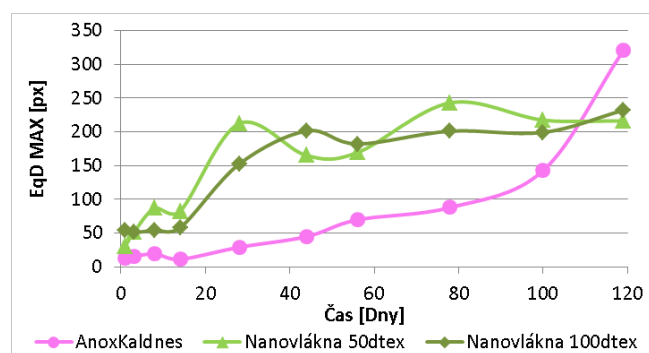
Ekvivalentní průměr kruhu (EqD) je parametr, který představuje průměr kružnice, která by měla stejnou plochu (obsah) jako daný objekt (kolonie).

Minimální hodnota EqD (pro oba nosiče) je rovna 0.56 pixelu, což odpovídá obsahu 1 pixel². Více než 50 % všech objektů (pro oba nosiče) dosahuje ekvivalentního průměru v rozmezí 4 – 6 pixelu (11.7 – 17.6 μm). Průměrné hodnoty EqD u nosiče AnoxKaldnes jsou v průběhu experimentu rovna 7.5 pixelu, maximální hodnota EqD dosahuje hodnoty 325 pixelu (953 μm). Průměrné hodnoty EqD u nanovláčenného nosiče jsou v průběhu experimentu rovna 15 pixelů (44 μm), maximální hodnota EqD dosahuje hodnoty 230 pixelů (675 μm).

Průběh křivek (pro oba nosiče) koreluje s průběhem křivek pro parametry obvod a obsah. Parametr EqD poskytuje informaci o velikosti (průměru) kolonie, kde průměr je spočten z rovnice

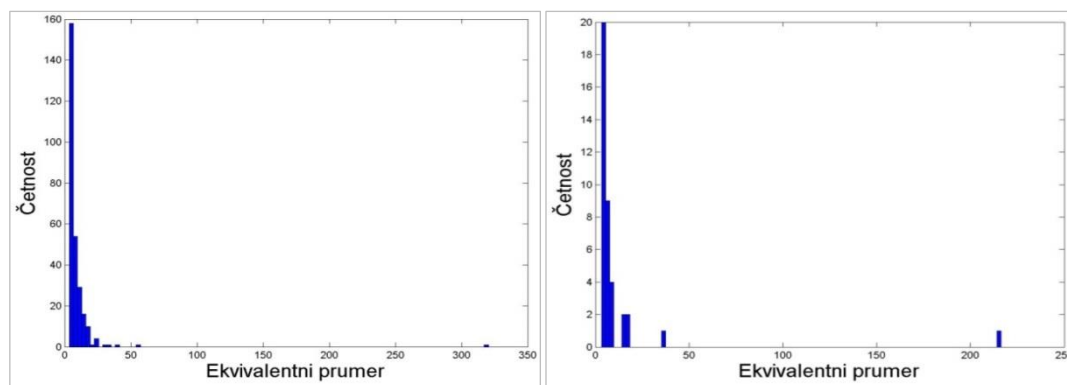
pro ekvivalentní průměr. Jelikož objekty na nosiči AnoxKaldnes vytvářejí vcelku kruhovitý tvar je parametr ekvivalentní průměr pro zde vytvářené kolonie přijatelný (chyba měření je vcelku malá). Pro nanovláknový nosič, kde kolonie jsou spíše protáhlého tvaru než kruhovitého, obnáší parametr hodnocení ekvivalentního průměru vyšší chybovost.

Výsledek pro oba nosiče je však v podstatě shodný. Na počátku experimentu je parametr EqD velice nízký (dosahuje hodnot maximálně 50 pixelů). V průběhu času se hodnoty EqD výrazně zvyšují, proto je nutné v tomto období dbát výrazné pozornosti především k parametru difuzivity. Pro velké kolonie, které by neobsahovali dostatečné množství porozity (resp. dostatečné množství dutin), by mohlo v důsledku zvyšování mohutnosti biofilmu docházet k vytváření anaerobních zón. Parametr EqD je hodnocení, které dopomáhá identifikovat oblasti (resp. časový interval), v němž může s nejvyšší pravděpodobností docházet k nutriční limitaci (resp. k nedostatečnému pronikání živin do všech částí biofilmu).



Obrázek 193 – Obrazová analýza – Ekvivalentní průměr kruhu (maximum)

Graf rozložení EqD objektů na povrchu nosičů dokládají následující histogramy (jednotkami na ose-x jsou pixely), které byly vyneseny pro objekty ve 120. den kultivace. Charakter histogramů byly shodné po celou dobu kultivace. V obou případech, pro oba typy nosičů, se jedná o exponenciální rozdělení.



Obrázek 194 – Obrazová analýza – Histogram hodnot ekvivalentních průměrů objektů

12) Solidita

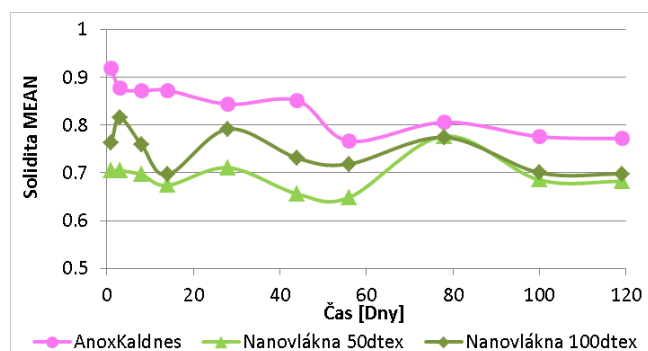
Solidita (pevnost) je skalární hodnota, která určuje podíl pixelů v konvexní obálce daného objektu. Parametr solidita bude pro kruhovitý objekt roven 1 (plocha objektu je shodná s konvexní obálkou k danému objektu), pro ostatní tvary či seskupení, bude hodnota solidity menší než 1. Z parametru

solidita lze vyčíst, zda se v objektu (v bakteriálním seskupení) nacházejí oblasti (kolonie), které by mohli obsahovat výčnělky nebo naopak důlky.

Pro komerční nosič AnoxKaldnes, kde biofilm narůstá na vnitřní straně žebrovní nosiče lze dle grafu níže (obrázek 195) vyhodnotit závěr, že biofilm je v případě tohoto nosiče více chráněn před působením okolního prostředí a obsahuje výčnělky a důlky. Tento závěr platí především pro počáteční kolonizaci, cca. do 44.dne kultivace; biofilm je tenký a střížné síly působí ještě velice málo, proto se v biofilmu mohou vytvářet výčnělky a důlky. V průběhu času, především po 60.dni kultivace, kdy biofilm je již mohutnější a střížné síly na něho jsou větší, je růst výčnělků omezen, čehož důsledkem je klesající tendence křivky solidity. Jelikož se biofilm nachází na vnitřní straně žebrovní a není vystaven přímému proudění okolní kapaliny, jsou hodnoty solidity oproti biofilmu na nanovlákněném nosiči vyšší.

Minimální hodnoty solidity (pro oba nosiče) je rovna 0.4. Více než 50 % všech objektů pro oba nosiče dosahuje stejné solidity jako je uvedeno v grafu níže pro průměrné hodnoty. Maximální hodnoty solidity dosahují pro oba nosiče hodnoty 1.

Pro nanovlákněný nosič, kde biofilm narůstá na nanovlákněných strukturách, je biofilm přímo vystaven působení okolo proudící kapaliny a tedy působení střížných sil. Povrch biofilmu bude velice hladký, bez přítomnosti výčnělků či důlků, čemuž odpovídají nižší hodnoty parametru solidity v grafu níže (obrázek 195). Téměř konstantní průběh hodnocení solidity nanovlákněného nosiče dokládá, že biofilm zde kolonizující povrch si zachovává stejnou strukturu po celou dobu kultivace. V důsledku velkých střížných sil na povrchu nosiče je struktura biofilmu na nanovlákněném nosiči po celou dobu velice stejnorodá.



Obrázek 195 – Obrazová analýza – Solidita (průměr)

This work was supported by the following projects:

The state subsidy of the Czech Republic within the project 2B08062 AROMAGEN.

The research center ARTEC, MŠMT project 1M0554.

The state subsidy of the Czech Republic within the ALFA project Modified biomass carriers for wastewater treatment - TA01021764.

The state subsidy of the Czech Republic within the Eureka project Application of magnetic field for biological wastewater treatment - LF11016.

The Ministry of Education of the Czech Republic within the SGS project no. 78001/115 on the Technical University of Liberec

The Project OP VaVpl Centre for Nanomaterials, Advanced Technologies and Innovation CZ.1.05/2.1.00/01.0005.

Práce byla podpořena následujícími projekty:

Projekt 2B08062 AROMAGEN podporovaného MŠMT ČR.

Výzkumné centrum Artec, MŠMT projektu číslo 1M0554.

Projekt TA01021764 Modifikované nosiče biomasy pro čištění odpadních vod, programu ALFA, poskytovatele TAČR.

Státní dotace České republiky v rámci projektu Eureka, Aplikace magnetického pole na biologické čištění odpadních vod - LF11016.

Státní dotace Ministerstva školství ČR v rámci projektu SGS číslo 78001/115 na Technické univerzitě v Liberci.

Projekt OP VaVpl Centrum pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace CZ.1.05/2.1.00/01.0005.

Disertační práce – Vývoj nanovláknenného nosiče pro hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou
a využití obrazové analýzy pro hodnocení biofilmových struktur

Grafická úprava a sazba

Lucie Křiklavová

Technická univerzita v Liberci, Studentská 2, 461 17 Liberec 1

<http://www.tul.cz/>, e-mail: lucie.kriklavova@tul.cz

Neprošlo jazykovou úpravou.

V Liberci 2013, počet stran 185.